THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

par

Geneviève LESPINATS

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : ANTIGENES ASSOCIES AUX TUMEURS A PLASMOCYTES DE LA SOURIS BALB/C

Soutenue le 29 AVR 1971 devant la Commission d'Examen :

MM. F. CHAPEVILLE — Président

J.M. DUBERT

A. LWOFF — Examinateurs

P. BURTIN

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

par

Geneviève LESPINATS

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : ANTIGENES ASSOCIES AUX TUMEURS A PLASMOCYTES DE LA SOURIS BALB/C

Soutenue le devant la Commission d'Examen :

MM. F. CHAPEVILLE Président

J.M. DUBERT

A. LWOFF Examinateurs

P. BURTIN

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Monsieur A. LWOFF

Directeur de l'Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer

qui m'a permis d'y mener ce travail.

Je lui adresse mes sincères remerciements pour ses critiques, et l'intérêt qu'il a manifesté à ce travail

A Monsieur F. CHAPEVILLE

Professeur à la Faculté des Sciences de Paris

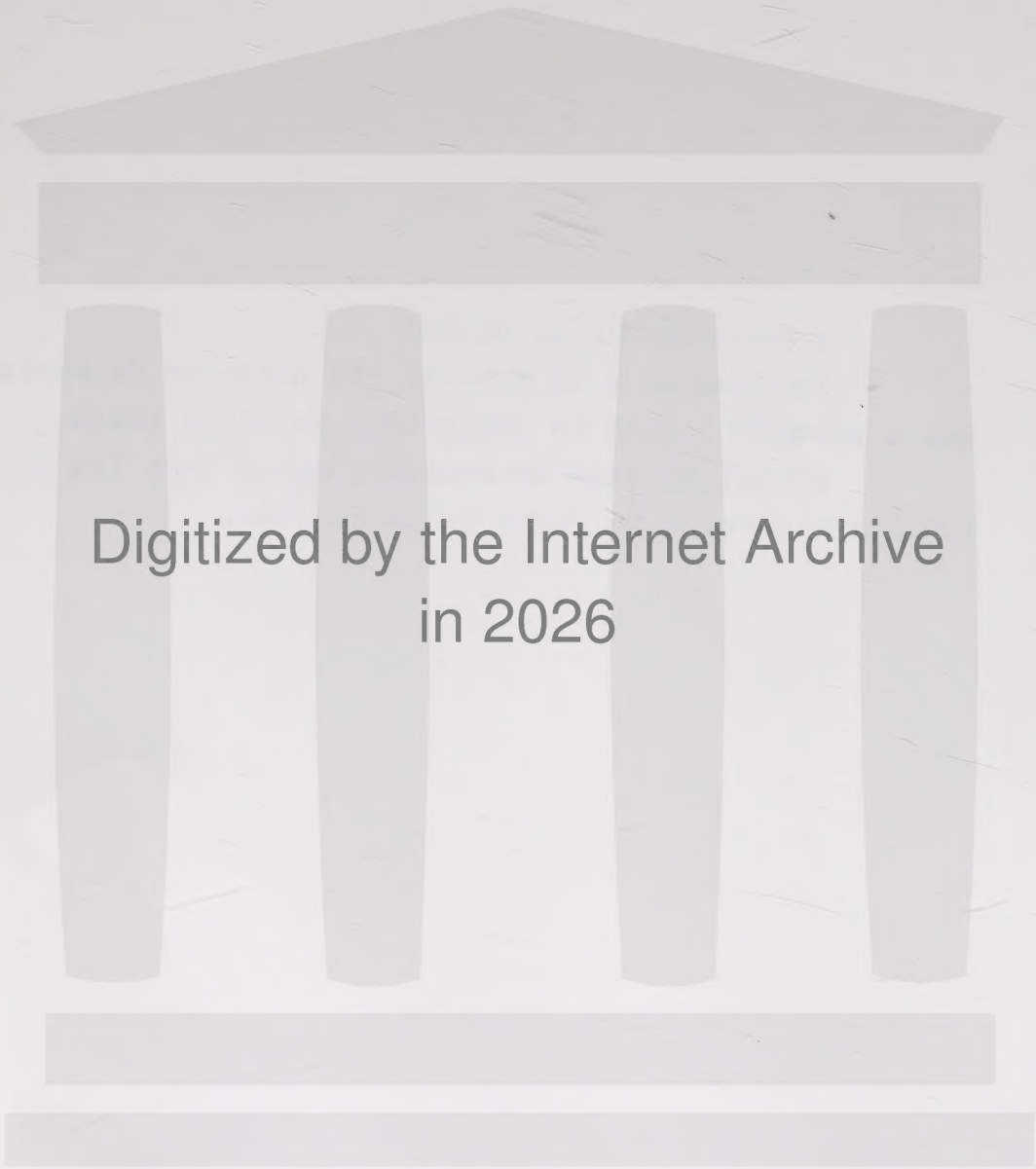
qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

A Monsieur J. M. DUBERT

Professeur à la Faculté des Sciences de Paris

qui a accepté d'être le rapporteur de cette thèse.

Je lui exprime ma reconnaissance pour les conseils qu'il m'a adressé au cours de ce travail.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550026_0008

A Monsieur P. BURTIN

Directeur de Recherches au CNRS

qui m'a accueillie dans son service. Il n'a cessé de me conseiller et de m'encourager.

Je lui exprime toute ma gratitude.

A Monsieur P. GRABAR

Chef de Service de l'Institut Pasteur

qui m'a initiée à la Recherche immunologique et a inspiré le sujet de cette thèse.

A tous mes amis de l'Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, qui m'ont aidé moralement et matériellement, et tout particulièrement à Catherine ADAM et à Marie-France POUPON.

ANTIGENES ASSOCIES AUX TUMEURS A PLASMOCYTES DE LA SOURIS BALB/C

INTRODUCTION

- Principes généraux page 1
- Immunité antitumorale 5
- Tumeurs à plasmocytes de la souris 14

MATERIEL ET METHODES 21

RESULTATS

I - Induction d'une résistance à la greffe tumorale 36

1. Immunisation avec des methodes autres que l'iodoacétate de sodium. 36

2. Immunisation avec des cellules incubées dans l'iodoacétate de sodium. 37

- Résistance vis à vis de la tumeur utilisée pour l'immunisation 38
- Immunisations croisées 43

II - Anticorps humoraux page 43

1. Test d'immunofluorescence de membrane 43

- Anticorps vis à vis de la tumeur utilisée pour l'immunisation. 44
- Anticorps chez les animaux porteurs de tumeur. 45
- Réactions croisées entre plusieurs lignées de tumeurs à plasmocytes. 45
- Isolement des anticorps. 48
- Fixation par des fractions cellulaires. 49
- Absence de réaction croisée avec des tumeurs d'autre origine. 49

2. Cytotoxicité. 50

3. Anticorps précipitants. 51

III - Immunité liée aux cellules lymphoïdes. 52

1. Test des microplaques. 52

2. Test d'inhibition de migration des macrophages. 56

IV - Mécanisme de l'immunité. 58

1. Expériences de transfert passif 59

2. Relation anticorps-résistance. 61

V - Plasmocytes cultivés in vitro. page 63

DISCUSSION 68

CONCLUSIONS 80

Les antigènes spécifiques de tumeur ont été recherchés dans de nombreuses tumeurs expérimentales, tout d'abord en tentant de provoquer une résistance à la croissance tumorale chez l'animal immunisé. Dans les tumeurs induites par des virus, on trouve un antigène commun à toutes les tumeurs induites par le même virus, dans les tumeurs chimioinduites, on trouve un antigène différent pour chaque tumeur. Mais pour les autres tumeurs, les résultats ont d'abord été décevants, bien souvent on n'est pas arrivé à obtenir une immunité antitumorale ou celle-ci a été très faible. Cependant, grâce aux tests in vitro développés récemment, on a pu mettre en évidence des antigènes spécifiques de tumeur dans la majorité des systèmes étudiés.

Les tumeurs à plasmocytes représentent des tumeurs expérimentales bien particulières :

- elles sont faites de cellules très différenciées, du point de vue histologique, et du point de vue de leur synthèse d'immunoglobuline.

- elles apparaissent après injection de Bayol F, huile minérale qui ne semble pas agir comme un cancérigène chimique. et elles contiennent des particules d'aspect viral, mais on ne connaît pas le mécanisme de la tumorigènèse.

Les immunoglobulines synthétisées par les cellules tumorales ont été très étudiées, par contre il n'existe pratiquement pas de données dans la littérature sur les antigènes spécifiques de ces tumeurs.

Dans l'introduction, nous rappelerons d'abord le développement des connaissances sur les antigènes spécifiques de tumeur et l'immunité antitumorale. Puis dans la deuxième partie, nous décrirons les tumeurs à plasmocytes expérimentales de la souris.

Notre travail a porté tout d'abord sur l'induction chez l'animal d'une immunité antitumorale. Cette immunité est difficile à induire, et plusieurs techniques, décrites comme efficaces dans d'autres systèmes, ont été ici sans effet. C'est en immunisant l'animal avec des cellules tumorales incubées dans l'iodoacétate de sodium que nous avons pu obtenir une résistance à la greffe tumorale, résistance qui est d'ailleurs modérée. C'est ce que nous expliquerons dans le chapitre I.

Nous avons ensuite recherché si on pouvait mettre en évidence des anticorps antitumeur dans le sérum des animaux immunisés. Les anticorps ont été démontrés par immunofluorescence de membrane. Ils permettent de détecter sur les cellules tumorales des déterminants antigéniques multiples (chapitre II).

Nous avons aussi recherché si les cellules lymphoïdes immunes réagissaient avec les cellules tumorales, et deux sortes de réactions ont été mises en évidence : d'une part les cellules lymphoïdes ont une action cytotoxique sur les cellules tumorales, d'autre part elles libèrent, en présence de l'antigène, un facteur d'inhibition de migration des macrophages (Chapitre III).

L'immunité antitumorale chez l'animal, peut être due à une action des anticorps humoraux sur la tumeur, ou à une action directe des lymphocytes sensibilisés, ou à une action conjuguée des deux. Dans notre système, ce sont avant tout les cellules lymphoïdes qui jouent un rôle important dans la résistance antitumorale (chapitre IV).

Enfin dans le chapitre V, nous aborderons le problème des antigènes de tumeur dans les cellules tumorales cultivées in vitro. Les propriétés de ces cellules ont été comparées à celles des cellules qui se développent chez l'animal.

Au terme de cette étude, nous discuterons :

- le mécanisme de l'immunité, avant tout de type cellulaire
- la nature des antigènes associés à ces tumeurs, qui paraissent multiples
- le mécanisme de la tumorigénèse des tumeurs à plasmocytes.

PRINCIPES GENERAUX

Le problème des antigènes de tumeur et de l'immunité anti-tumorale a été abordé pour rechercher par des méthodes immunologiques si les cellules tumorales diffèrent des cellules normales ; par ailleurs avec l'arrière pensée d'une voie thérapeutique , pour chercher si on peut provoquer une réaction de rejet de l'hote contre la tumeur.

Le principe général des expériences consiste à immuniser un groupe d'animaux avec des cellules tumorales, mais de façon telle qu'il n'y ait pas développement de tumeur, puis à greffer la tumeur. On observe si les animaux traités présentent une résistance vis à vis de la croissance tumorale, par rapport à des animaux témoins.

Déjà en 1916, Tyzzer écrivait : "il est tout à fait impossible de présenter dans un espace raisonnable une revue complète de toutes les investigations sur l'immunité tumorale " (1).

Mais les premières expériences furent faites sur des souches d'animaux génétiquement non homogènes, et la résistance obtenue était probablement due à une immunité vis à vis d'antigènes de transplantation individuels, plutôt qu'à des antigènes spécifiques de tumeur.

Quand les réactions de rejet de greffe ont été mieux connues, il est apparu que pour étudier les antigènes spécifiques de tumeur, il fallait éliminer les facteurs d'histocompatibilité, en travaillant dans un système syngénique. La constitution de souches animales homozygotes, dans lesquelles tous les animaux sont identiques entre eux, a permis cette expérimentation. Les animaux répondant à un certain nombre de critères (au moins 25 générations obtenues par croisement dans une même portée, tolérance aux greffes cutanées réciproques) peuvent être considérés comme histocompatibles entre eux, c'est -à-dire qu'à l'intérieur d'une colonie dite "fermée" les tissus de tous les animaux ont la même constitution antigénique. On pourra alors, si on observe une réaction de rejet de greffe tumorale chez des animaux syngénéiques immunisés avec cette tumeur, penser que cette réaction est due à des antigènes spécifiques de tumeur, présents dans la tumeur, et non dans les tissus normaux.

Le mode d'immunisation est très important. Les expériences faites à l'aide de cellules tuées ou de fractions cellulaires ont en général abouti à l'échec, ou à l'obtention d'une accélération de la croissance tumorale, c'est à dire d'une facilitation. C'est avec des cellules entières, dites "viables", qu'ont été obtenus la grande majorité des résultats. On peut utiliser des cellules tumorales en trop faible quantité pour entraîner le développement d'une tumeur; on peut inoculer la tumeur, puis pratiquer l'exérèse

chirurgicale, ou la ligature entrainant la nécrose. On peut aussi utiliser des cellules bloquées dans leur division, on a beaucoup utilisé des cellules irradiées, mais certaines cellules ainsi traitées perdent leur antigénicité. Nous avons utilisé des cellules incubées dans l'iodoacétate de sodium ; cette technique qui bloque la division cellulaire sans détruire les cellules ni les antigènes de surface permet d'injecter des doses de cellules relativement élevées, à plusieurs reprises. Le choix de la méthode d'immunisation est important, et avant de conclure à l'absence d'antigènes de tumeur, il convient d'essayer plusieurs techniques.

Pour tester la résistance des animaux, on inocule la tumeur et on observe sa croissance. Comme il s'agit d'une immunité faible en général, il importe pour ne pas déborder les défenses immunitaires, d'inoculer la dose minimale de cellules qui provoque une tumeur chez tous ou la grande majorité des animaux témoins, cette dose étant déterminée par des essais préalables.

Pour apprécier le niveau de résistance des animaux, on peut compter le nombre d'animaux présentant une tumeur au bout d'un temps donné, noter le temps écoulé entre la greffe et l'apparition d'une tumeur macroscopiquement décelable, le temps écoulé entre la greffe et la mort des animaux, la vitesse de croissance des tumeurs par des mesures à intervalles réguliers. Les résultats sont comparés à ceux obtenus chez des animaux témoins, de même age et de même sexe, n'ayant pas reçu de traitement, ou ayant reçu un traitement

témoin, et auxquels on a fait la même greffe tumorale.

On a pu par ces méthodes démontrer une immunité tumorale dans plusieurs systèmes et on a ensuite tenté d'aller plus loin dans cette étude ; un certain nombre de techniques, mises au point en général pour étudier les antigènes d'histocompatibilité, ont été appliquées aux systèmes des antigènes spécifiques de tumeur.

Les tests in vitro de cytotoxicité, d'immunofluorescence, d'inhibition de colonies, et in vivo les expériences de transfert passif de sérum ou de cellules immunologiquement compétentes, ont permis dans un certain nombre de systèmes d'affirmer la présence d'anticorps dans le sérum des animaux immunisés, d'étudier les antigènes vis à vis desquels ils sont dirigés, d'étudier le mécanisme de l'immunité tumorale.

Ce type de travail a débuté progressivement. C'est depuis 1953, que, fait sur des souches animales génétiquement pures et bien contrôlées, il connaît un très grand développement, mais la lecture des travaux faits avant cette date (2, 3), montre que, si peu de problèmes avaient été résolus, pratiquement tous avaient été abordés.

La grande majorité de ces travaux a été faite chez la souris, animal de manipulation commode, où de nombreuses races ont été établies, chez lequel on connaît un grand nombre de tumeurs induites et spontanées.

INDUCTION D'UNE RESISTANCE A LA GREFFE TUMORALE

L'établissement d'une résistance à la greffe tumorale par une immunisation préalable a pu être démontré pour un grand nombre de tumeurs :

Tumeurs induites par des carcinogènes chimiques

On a surtout étudié des tumeurs induites par des hydrocarbures polycycliques :

- Méthylcholanthrène (4, 5)
- Benzopyrène (6, 7)
- Diméthylaminobenzène (9)

Du point de vue histologique, il s'agit surtout de fibrosarcomes, mais aussi de leucémies (10), d'adénocarcinomes (11) et d'hépatomes (9).

Tumeurs induites par des virus

- par des virus à A.D.N.
  - virus du polyome (12, 13)
  - virus SV 40 (14, 15)
- par des virus à A.R.N.
  - virus de Gross (16)
  - virus de Moloney (17, 18)
  - virus de Rauscher (19)
  - virus de Graffi (20)
  - virus des tumeurs mammaires de souris (21).

Il s'agit de fibrosarcomes, de lymphomes et d'adénocarcinomes mammaires.

ANTICORPS HUMORAUX

Les principales techniques qui permettent de les détecter sont le test d'immunofluorescence de membrane, le test de cytotoxicité et le test d'immune adhérence.

Immunofluorescence de membrane

Cette technique a permis de déceler des anticorps dirigés vis à vis des antigènes de surface dans les différents types de tumeur connus. Mise au point par Möller (22), elle a été appliquée:

- aux tumeurs induites par des carcinogènes chimiques (23, 24)
- à des tumeurs induites par des virus (25, 26, 18)

Dans ces différents systèmes, des anticorps humoraux ont ainsi pu être mis en évidence.

Test de cytotoxicité

Ce test, mis au point d'abord pour étudier les isoanticorps (27) a été appliqué aux systèmes de tumeurs.

Il s'est surtout révélé intéressant pour les tumeurs induites par les virus à A.R.N. :

- virus de Gross (28)
- virus de Moloney (18)
- virus de tumeur mammaire de souris (29).

Les résultats ont été décevants pour les autres types de tumeur, des antisérums dirigés contre des tumeurs chimiquement induites ne se sont pas montrés cytotoxiques (24, 7). Ces antisérums ne contiennent peut-être pas d'anticorps cytotoxiques ; mais les résultats négatifs ont aussi été attribués soit à un trop grand espacement des sites antigéniques, (30) soit à l'hétérogénéité des anticorps, les anticorps ne fixant pas le complément bloquant les sites réactifs et empêchant les autres d'agir (31).

Immune adhérence

Ce test met aussi en évidence la fixation d'immunoglobulines anticorps à la surface des cellules tumorales (32). Il a été appliqué avec succès à des tumeurs induites par des carcinogènes chimiques (33), et induites par des virus (34).

ANTIGÈNES DE TUMEUR

La synthèse des études, in vivo de l'immunité tumorale, et in vitro des anticorps humoraux, permet une classification des antigènes associés aux tumeurs.

Tumeurs induites par des carcinogènes chimiques

Elles possèdent un antigène individuel de tumeur, les tumeurs possèdent chacune un antigène différent, même si elles sont induites par la même substance chimique. L'antigénicité est d'autant plus forte que la période de latence est plus courte. (35)

Certains auteurs ont cependant trouvé des réactions croisées entre différentes tumeurs induites par le Méthylcholanthrène (5, 36, 37), ce qui fait émettre l'hypothèse qu'à côté d'un antigène majeur pouvaient exister plusieurs modifications antigéniques mineures.

Tumeurs induites par des virus

- induites par des virus à A.D.N.

La plupart des tumeurs ne produisent pas de virus infectieux.

L'antigène est commun à toutes les tumeurs induites par le même virus, et même chez des animaux d'espèces différentes.

On peut immuniser avec des cellules irradiées, avec des cellules tumorales ne produisant pas la particule virale, avec le virus à condion qu'il ne soit pas inactivé. On pense donc que ce n'est pas le virus qui est directement responsable de l'immunité, mais que le virus provoque l'apparition de quelques cellules néoplasiques, qui provoquent l'apparition d'anticorps antitumeur, d'où destruction de ces quelques cellules (38).

- induites par des virus à A.R.N.

Les cellules tumorales produisent du virus infectieux sauf dans les cas où le virus est défectif.

Ces tumeurs peuvent être induites dans certaines souches à l'aide de filtrats de tumeur mais bien souvent elle apparaissent spontanément dans des souches de souris infectées par le virus correspondant. Ce groupe inclut donc des tumeurs spontanées trouvées communément dans les conditions de laboratoire.

Cette infection congénitale est associée à une tolérance immunitaire, et il est difficile d'induire une résistance à la transplantation des tumeurs dues à ces virus dans les souches parasitées (39, 40) :

a. tumeurs dues au virus de Gross (41). L'antigène correspondant est trouvé :

- dans les leucémies, mais aussi dans les tissus normaux des souches à haute incidence.

- dans les leucémies, mais pas dans les tissus normaux des souches à faible incidence.

b. tumeurs induites par le groupe des virus de Friend, Moloney, Rauscher et Graffi. On trouve une antigénicité commune aux tumeurs induites par ces virus (42, 43).

c. tumeurs dues aux virus des tumeurs mammaires (44). On obtient difficilement une résistance dans les souches infectées par les virus, mais on obtient une bonne résistance dans les souches ne contenant pas les virus. L'antigène est retrouvé dans l'adénome bénin qui précède la tumeur.

Mais à côté de ces antigènes communs à un virus ou à un groupe de virus, on a détecté des antigènes individuels, coexistant avec les antigènes communs, dans les adénocarcinomes mammaires de la souris (45, 46, 47).

Enfin, des tumeurs induites par un cancérigène chimique, le Méthylcholanthrène, peuvent contenir, à côté de leur antigène spécifique, l'antigène de Gross (48). Des virus ont été trouvés

dans ces tumeurs (49). On peut faire l'hypothèse qu'il s'agit de tumeurs secondairement infectées par un virus, et antigéniquement converties. On a montré en effet qu'une tumeur infectée secondairement par un virus peut acquérir un nouvel antigène lié au virus. Une autre hypothèse est que le cancérigène chimique active un virus qui était présent à l'état latent.

Si la distinction entre tumeurs induites par des carcinogènes chimiques et tumeurs induites par des virus est entièrement justifiée du point de vue immunologique, il existe cependant quelques cas difficiles à classer.

Tumeurs dites spontanées

Certaines tumeurs apparaissent spontanément, mais on en connaît bien la cause virale, elles sont fréquentes dans certaines souches de souris infectées par le virus responsable. C'est le cas des leucémies dues au virus de Gross, et des adénocarcinomes mammaires dus aux virus de tumeur mammaire.

Certaines leucémies de souris représentent un cas particulier. Ce sont les leucémies qui possèdent l'antigène TL. Cet antigène est spécifique d'organe, présent dans le thymus de certaines souches dites TL^+. Dans les souches TL^-, cet antigène peut apparaître dans les cellules de leucémies d'apparition spontanée. On n'a pas mis de virus en évidence dans ces tumeurs (50).

En dehors de ces leucémies et adénocarcinomes mammaires de souris, les tumeurs spontanées ont été peu étudiées : quelques tumeurs chez le rat (51, 52) chez la souris (53). Dans l'ensemble, elles se sont montrées peu antigéniques.

Plusieurs fois prises comme tumeur témoin, par comparaison avec des tumeurs chimiquement induites, les tumeurs spontanées se sont montrées non immunogéniques, c'est-à-dire que la résistance vis à vis de ces tumeurs n'a pas pu être obtenue avec des méthodes efficaces pour des sarcomes induits par le méthylcholanthrène (5, 54, 55).

MECANISME DE L'IMMUNITE ANTITUMORALE

Deux types d'expériences permettent d'aborder ces problèmes :

- les expériences in vivo de transfert passif (56).

On transfère à des animaux neufs du sérum ou des cellules immunologiquement compétentes provenant d'animaux immunisés, et on suit chez ces animaux le développement d'une greffe tumorale. On peut ainsi étudier le rôle respectif des anticorps et des cellules sur le développement tumoral, faire la part de l'immunité de type humoral et de l'immunité de type cellulaire.

- les expériences in vitro :

a) d'inhibition de colonies (57).

On met en contact cellules immunologiquement compétentes provenant d'animaux immunisés et cellules tumorales, et on observe

la capacité des cellules tumorales à former des colonies ; en ajoutant du sérum immun à ce système, on peut voir comment il interfère sur l'action cellules immunes-cellules tumorales.

b) La technique des microplaques (58)

Le principe est le même, mais au lieu de déterminer le nombre de colonies de cellules tumorales qui se sont développées, on compte le nombre de cellules tumorales qui restent adhérentes après action des cellules immunologiquement compétentes. On peut aussi étudier l'effet des anticorps sur la réaction (59).

c) Le test d'inhibition de migration des macrophages (60).

Les macrophages ont une mobilité qui leur permet de se déplacer sur une surface. Cette mobilité est réduite en présence de cellules lymphoïdes immunes et de l'antigène correspondant. L'immobilisation des macrophages est due à un facteur (M.I.F.) (61) qui est synthétisé par les lymphocytes en contact avec l'antigène vis à vis duquel ils sont immuns. Cette réaction est obtenue avec des lymphocytes provenant d'animaux présentant une réaction cutanée d'hypersensibilité retardée. Le parallélisme entre les réactions in vivo d'hypersensibilité retardée et in vitro d'inhibition de migration des macrophages a été montré avec des antigènes de tumeur (62), Bloom et coll ont montré une corrélation entre ces réactions et l'immunité de transplantation. La réaction d'inhibition de migration des macrophages donne donc une estimation indirecte de l'état d'immunité antitumorale. Le facteur d'inhibition

de la migration n'étant produit qu'en présence de l'antigène, cette technique permet aussi d'étudier celui-ci.

Action des cellules immunologiquement compétentes

Si on transfère à des animaux neufs des cellules provenant d'animaux immunisés, on peut leur conférer une résistance vis à vis de la graffe tumorale.

Ces cellules peuvent provenir des ganglions ou de la rate des animaux immuns (56), les cellules d'origine péritonéale sont plus active (63).

L'efficacité de ces cellules dépend de la proportion entre cellules tumorales et cellules immunes (64), ainsi que du mode d'immunisation des animaux donneurs et de l'intervalle séparant la fin de l'immunisation de l'animal donneur de la greffe tumorale du receveur (65).

Par des tests étudiant in vitro l'immunité de type cellulaire, on a confirmé l'existence de cette immunité, de groupe pour des tumeurs induites par des virus (66, 67), individuelle pour des tumeurs chimiquement induites (68).

Action des anticorps sériques

Le rôle des anticorps est beaucoup moins clair, les expériences de transfert passif de sérum provenant d'animaux immunisés à donné des résultats variables :

Selon les auteurs et les systèmes utilisés, le sérum :

- est sans effet (56)
- retarde un peu la croissance tumorale (65).

- accélère la croissance tumorale (24, 69)
- retarde ou accélère, selon la tumeur (70)
- confère une facilitation avec de fortes doses, une résistance avec de faibles doses (71).
- les anticorps de type 19S donneraient surtout une inhibition, les anticorps de type 7S surtout une facilitation (72).

Avec le test d'inhibition de colonies, on a observé :
- soit que le sérum provenant d'animaux immuns est sans effet sur l'action antitumorale des cellules compétentes (73)
- soit qu'il diminue cette action, c'est-à-dire qu'il a une action antagoniste, facilitant le développement de colonies (74).

Ainsi le rôle de l'immunité de type cellulaire semble bien établi ; les cellules compétentes sensibilisées ont une action antitumorale importante. Les anticorps humoraux ont, selon les cas, rarement une action synergique, souvent une action antagoniste ou nulle.

TUMEURS A PLASMOCYTES DE LA SOURIS

INDUCTION - CYTOLOGIE

Les tumeurs à plasmocytes ont été induites chez la souris Balb/c par injection intra péritonéale de Bayol F, huile minérale distillée du pétrole.

L'injection de Bayol F induit des ascites hémorragiques et plasmocytaires qui apparaissent 6 à 10 mois après le début des injections (75, 76).

Très rapidement après l'injection d'huile, la surface du péritoine se couvre d'un tissu réactif, qui s'organise en paraffinome péritonéal multinodulaire, contenant des histiocytes, des macrophages, des cellules plurinuclées, des plasmoblastes et des plasmocytes. C'est au sein de granulome qu'apparaît le plasmosarcome.

Ces tumeurs sont constituées de cellules hautement différenciées ; après coloration par la méthode de May-Grünwald Giemsa, les cellules, très grosses, apparaissent avec un cytoplasme bleu, un archoplasme, région claire paranucléaire, un volumineux noyau présentant des mottes de chromatine, souvent polylobé ou double.

PROTEINES DE MYELOME

Ces tumeurs sont caractérisées par la formation d'immunoglobulines, que l'on trouve dans le sérum des animaux porteurs de tumeur.

Chaque immunoglobuline normale est formée de 2 chaînes légères (L) qui peuvent être de type Kappa ou Lambda, et de 2 chaînes lourdes (H) qui peuvent être du type G_1, G_2, A ou M (77) Les plasmocytes tumoraux synthétisent soit des chaînes L isolées, soit des molécules complètes. Que les chaînes L soient isolées ou associées à des chaînes H, elles sont pratiquement toujours de type Kappa, les chaînes Lambda étant exceptionnelles (78). Nous même n'avons jamais trouvé qu'un seul type de chaîne L, Pour les chaînes H, il s'agit dans la grande majorité des cas du type A, rarement G_1 ou G_2, exceptionnellement M (78), type que nous mêmes n'avons jamais rencontré.

A l'intérieur d'une même classe d'immunoglobulines normales, les molécules présentent de légères différences entre elles. Les molécules des protéines de myélome sont plus homogènes, mais diffèrent d'une tumeur à l'autre, même quand elles appartiennent à la même classe d'immunoglobulines. Les études de digestion ménagée ont montré que les peptides diffèrent d'une paraprotéine à une autre (79, 80) et l'étude antigénique montre que l'on peut obtenir des antisérums spécifiques, réagissant avec une paraprotéine et non avec une autre. C'est un moyen d'identification et nous n'avons jamais jusqu'à maintenant trouvé deux paraprotéines identiques.

Ces tumeurs sont maintenues par transplantation de souris à souris, et on peut vérifier qu'au cours des passages, la synthèse d'immunoglobuline se maintient stable, la même paraprotéine continuant à être synthétisée tout au cours des passages.

Chaque lignée issue d'une tumeur primaire synthétise donc une protéine très caractéristique, et identifiable par des méthodes immunochimiques.

AGENTS DE LA TUMORIGENESE

L'agent responsable de ces tumeurs n'est pas connu.

On ignore le mode d'action du Bayol F. C'est une huile minérale blanche distillée du pétrole à 350°, traitée par l'acide sulfurique pour éliminer les hydrocarbures insaturés. Il ne contient pas d'hydrocarbures polycycliques connus pour leur action cancérigène. Les composés qu'il contient, composés cycliques naphténiques saturés et composés paraffiniques, ne sont pas métabolisés par l'organisme (81)

On ne peut pas dire qu'il s'agit d'un cancérigène au sens classique du terme. L'inoculation sous-cutanée ne donne pas lieu à la formation de tumeurs. Son action n'est pas spécifique, des films de plastique intrapéritonéaux pouvant aussi induire des tumeurs à plasmocytes (82) Si la majorité des tumeurs qui apparaissent après injection de Bayol F sont des tumeurs à plasmocytes, nous avons aussi observé quelques sarcomes (83).

Cependant le Bayol F joue un rôle important, car en l'absence d'injection d'huile ou de plastique, les tumeurs spontanées sont exceptionnelles (84).

On trouve dans les cellules tumorales de nombreuses particules virales, du type A de Bernhard (85). Tous les auteurs qui ont fait une étude ultrastructurale des plasmocytes tumoraux (86, 87, 88), ainsi que nous-mêmes, les y ont retrouvées. Des essais ont été faits pour induire des tumeurs à l'aide de fractions subcellulaires, dépourvues de cellules et riches en particules virales. Certains ont échoué (87,86), mais certains auteurs ont pu provoquer ainsi l'apparition de tumeurs à plasmocytes (89, 90). Le fait qu'on a trouvé dans des tumeurs induites par le méthylcholanthrène des antigènes du virus de Gross a fait penser que certains agents physiques ou chimiques pouvaient induire des tumeurs en agissant comme activateurs d'un virus (91, 92). C'est une hyptohèse qu'on peut envisager dans le cas des tumeurs à plasmocytes.

Il faut cependant noter que dans les autres tumeurs dont l'étiologie virale a été bien démontrée, on trouve des particules de type A, mais associées :

- à des particules de type C ; leucémie de Friend, de Moloney
- à des particules de type B ; tumeurs mammaires de souris, leucémies de Graffi
- à des particules B et C : leucémie de Gross.

Dans les tumeurs à plasmocytes on ne trouve ni particule B, ni particule C.

La signification des particules de type A n'est pas connue.

Une autre hypothèse a été avancée (93) : l'injection d'huile, entraînant une lyse de tissu dans la cavité péritonéale, provoquerait une réaction autoimmune, de type lupus érythémateux, avec de nombreuses cellules formant des anticorps anti acides nucléiques. Une ou plusieurs de ces cellules serait touchée par la transformation néoplasique. La survenue de tumeurs est assez fréquente dans les maladies autoimmunes chez la souris NZB (94), dans les tissus desquelles on trouve d'ailleurs de nombreuses particules virales (95).

Cette hypothèse a été faite sur la constatation de la production fréquente (10 %) d'anticorps anti bases puriques et pyrimidiques par les plasmocytes tumoraux.

Ainsi les rôles d'un produit chimique, de particules virales et d'un processus autoimmun paraissent intriqués, et impossibles à l'heure actuelle à préciser.

IMMUNITE TUMORALE ET TUMEURS A PLASMOCYTES

En ce qui concerne l'immunité tumorale dans les tumeurs à plasmocytes, il existe très peu de données, elles sont très dispersées. Nous avons trouvé 3 publications touchant à ce sujet :

- Whisson et Connors (96) signalent que les souris greffées avec une tumeur à plasmocytes, traitées par le N-N di 2 chloroéthylaniline qui entraîne une régression de la tumeur, sont ensuite un peu résistantes à une 2ème greffe de la même tumeur, le développement de la tumeur est un peu plus lent que chez les animaux témoins.

- Breyere et coll (89), décrivent l'isolement d'un virus à partir d'une tumeur spontanée de souris C3H. Ce virus provoque l'apparition de tumeurs. On peut immuniser des animaux vis à vis d'une tumeur ainsi provoquée avec une dose sublimaire de cellules tumorales. On trouve une immunité commune à toutes les tumeurs induites par ce virus.

- Yamada et coll (97) diminuent la fréquence d'apparition de tumeurs à plasmpcytes après injection de Bayol F en traitant les souris avec des hormones hypophysaires. Dans le sérum des souris ainsi protégées, on trouve des anticorps cytotoxiques vis à vis de certaines lignées de tumeurs à plasmocytes ; les macrophages péritonéaux de ces souris ont une activité phagocytique envers certaines tumeurs. Les activités cytotoxiques du sérum et phagocytiques des macrophages ne coincident pas. Les réactions croisées entre sérums et tumeurs d'une part, macrophages et tumeurs d'autre part sont extrêmement complexes.

On a donc très peu de données sur les antigènes des tumeurs à plasmocytes.

Nous avons voulu voir si on pouvait mettre en évidence des antigènes spécifiques de tumeur dans ces tumeurs qui présentent les particularités :

- d'être faites de cellules hautement différenciées, du point de vue morphologique par leur aspect cytologique, et du point de vue biologique par la synthèse d'une immunoglobuline.

- d'être d'étiologie inconnue, les rôles respectifs de l'huile minérale utilisée pour les faire apparaître et des particules virales qu'on y trouve étant discutés.

Nous avons vu qu'on oppose schématiquement les tumeurs provoquées par des cancérigènes chimiques qui possèdent un antigène individuel, et les tumeurs provoquées par des virus qui possèdent un antigène commun aux tumeurs provoquées par le même virus. On pouvait espérer qu'une étude immunologique permettrait de classer les tumeurs à plasmocytes dans une de ces deux grandes catégories.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Les souris Balb/c provenant de Gif sur Yvette sont maintenues en souche homozygote depuis 1962 à l'Institut du Cancer, l'isogénie est vérifiée régulièrement par greffes cutanées.

Induction des tumeurs. Lignées tumorales

Les tumeurs primaires ont été obtenues selon la méthode de Potter (75) par injection intrapéritonéale de Bayol F (Esso Corp.) à raison de 3 fois 0,5 ml à un mois d'intervalle.

Chaque fois qu'une tumeur a été trouvée, elle a été transplantée par voie sous-cutanée à des souris âgées de 2 à 3 mois. Quand la greffe a donné naissance à des tumeurs, celles-ci sont passées régulièrement à des souris isologues par voie sous-cutanée.

Le tableau I indique les tumeurs utilisées, le nombre de passages au moment où elles ont été utilisées, la protéine myélomatéuse qu'elles synthétisent, la moyenne du temps s'écoulant entre la greffe tumorale et l'apparition d'une tumeur macroscopiquement décelable d'unenpart, et la mort des animaux d'autre part, pour une inoculation de 5.10^5 cellules, pour chacune de ces tumeurs.

Immunisation

Toutes les expériences d'immunisation ont été faites sur des souris de sexe mâle. On évite ainsi les réactions de rejet dues aux antigènes d'histocompatibilité liés au chromosome Y (97 bis), réactions qui peuvent s'observer chez les souris femelles immunisées avec des tissus de souris mâles.

TABLEAU I

Lignée tumorale	Nombre de Passages	Paraprotéine synthétisée	Durée moyenne d'apparition de tumeur	Durée moyenne d'évolution
E_2	38-48	IgG_2	20 jours	46 jours
E_8	44-55	IgA	20	52
K_{10}	3-10	IgG_2	55	94
A_1	6-18	IgA	30	80
A_3	1-10	IgA	35	55
A_7	1-8	L	20	42
A_2*	15-18	IgG_1		

* : Cette tumeur ne se développe régulièrement que chez des animaux irradiés. Elle est entretenue sur des souris recevant une irradiation totale de 250 r.

Les injections immunisantes sont faites avec des cellules en suspension. Les suspensions de cellules tumorales sont préparées à partir des tumeurs solides, dans une solution saline tamponée à pH 7,4 additionnée de 1 % de polyéthylène glycol de poids moléculaire 6.000. La tumeur prélevée est coupée aux ciseaux en petits morceaux, dissociée dans lestampon et passée sur double épaisseur de gaze. Les cellules sont lavées 3 fois dans le tampon, par centrifugation de 5 minutes à 500 tours/minute. Les cellules non colorées par le Bleu Trypan sont comptées à l'hématimètre et ajustées à la concentration désirée.

Plusieurs modes d'immunisation ont été essayés :

- avec des cellules tumorales non modifiées, à une dose inférieure à la dose qui provoque une tumeur, 10^2 cellules par voie sous-cutanée à chaque injection, 8 injections à 2 semaines d'intervalle.
- avec des cellules irradiées à 6.000r, 10^5 cellules par voie sous-cutanée à chaque injection, 8 injections à 2 semaines d'intervalle (58).
- avec l'aide d'un antimitotique : les animaux reçoivent une greffe tumorale, 3 semaines plus tard une injection intrapéritonéale de 1 mg de N-N di 2 chloroéthylaniline (CB 1074) qui provoque une régression de la tumeur (96).
- avec des cellules incubées dans l'iodoacétate de sodium, selon la méthode décrite par Appfel (98). C'est avec cette méthode qu'ont été poursuivies les expériences, les méthodes précédentes n'ayant pas donné de résultats significatifs. Les cellules sont incubées pendant une heure à 37°C dans une solution d'iodoacétate de

de sodium (Sigma) 10^{-3}M en tampon salin additionné de polyéthylène glycol, puis lavées et centrifugées 3 fois dans ce tampon.

Plusieurs modalités ont été essayées ; elles sont indiquées dans le tableau II.

Greffe tumorale

La greffe tumorale est faite 2 ou 3 semaines après la fin des injections immunisantes. Des animaux témoins reçoivent la même greffe, en même temps, ce sont des animaux de même âge et de même sexe que les animaux traités, soit n'ayant reçu aucun traitement, soit ayant reçu des cellules de rate de souris BALB/c normales, le même nombre d'injections, le même nombre de cellules, traitées de la même façon que les cellules tumorales.

Dans des essais préalables, la dose tumorale minimale donnant 80 à 100 % de prise tumorale chez des animaux non traités a été déterminée. Les cellules sont préparées par dissociation mécanique, de la même façon que pour l'immunisation. 5.10^5 cellules, dans 0,1 ml de tampon, sont injectées par voie sous cutanée. Selon la lignée tumorale, la tumeur est palpable au bout d'un temps qui varie un peu, et entraîne la mort dans un temps variable. Ces intervalles sont indiqués dans le tableau I. Pour plusieurs groupes, les animaux qui ne présentaient pas de tumeur 2 mois après la greffe ont reçu une 2ème injection de la même dose.

TABLEAU II

Modes d'immunisation avec des cellules traitées par l'iodoacétate de sodium

	Intervalle	Dose	Voie
1ère série		5.10^5 c.	SC
	14 jours		
		5.10^5 c.	SC
	14 jours		
		5.10^5 c.	SC
2ème série		5.10^5 c. + Adj.	SC
	14 jours		
		10^5 c.	SC
		10^5 c.	IP
	7 jours		
		2.10^5 c.	SC
		2.10^5 c.	IP
3ème série		10^5 c.	SC
		10^5 c.	IP
	7 jours		
		2.10^5 c.	SC
		2.10^5 c	IP
	7 jours		
		4.10^5 c.	SC
		4.10^5 c.	IP
4ème série		2.10^5 c.	SC
		2.10^5 c.	IP
	7 jours		
		2.10^5 c.	SC
		2.10^5 c.	IP
	7 jours		
		2.10^5 c.	SC
		2.10^5 c.	IP

Test d'immunofluorescence de membrane

Les animaux immunisés ont été saignés à l'oeil avec une pipette Pasteur; après coagulation, le sérum est centrifugé, puis décomplémenté par chauffage de 30 min. à 56°C.

Ils ont été saignés 2, 3, 4,5, et 6 semaines après la fin d'une série d'injections immunisantes de 3 semaines, ont reçu une autre série d'injections de 3 semaines, et ont été saignés 2, 3, 4, 6 et 8 semaines après la fin de ces injections (4ème série du tableau II).

La suspension de cellules est préparée à partir de la tumeur coupée en petits morceaux, suspendue dans 50 ml d'une solution de Trypsine à 0,25 % (Difco 1/250) contenant 5 gouttes de déoxyribonucléase à 0,1 % (Sigma), le mélange est agité sur agitateur magnétique pendant 60 minutes, à la température du laboratoire, selon la technique de Madden et Burk (9). Le surnageant est recueilli, les cellules sont lavées en tampon salin et centrifugées 3 fois. Le nombre de cellules non colorées par le Bleu Trypan est déterminé à l'hématimètre et la suspension est ajustée à 10^7 cellules par ml. Les suspensions ainsi obtenues sont pratiquement dépourvues de cellules colorées.

Le test est pratiqué selon la méthode décrite par Möller (22): chaque tube contenant 0,05 ml d'antisérum et 0,05 ml de la suspension de cellules (5.10^5c.) est incubé à 37°C pendant 15 minutes. Les cellules sont lavées 2 fois, puis incu-

bées pendant 15 minutes à 37° avec 0,05 ml de sérum de lapin anti globulines de souris conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (Institut Pasteur) 1:10. Les cellules sont lavées 2 fois, resuspendues dans 2 gouttes de tampon salin et examinées immédiatement avec un microscope à fluorescence Leitz.

Dans tous les tests ont été inclus des contrôles avec du sérum de souris normal et dans quelques tests un sérum de BBA/2 anti plasmocytes de BALB/c, comme contrôle positif. Les indices de fluorescence ont été calculés comme la proportion de cellules négatives dans l'échantillon exposé au sérum normal, moins la proportion de cellules négatives dans l'échantillon exposé au sérum test, divisé par la proportion de cellules négatives dans l'échantillon exposé au sérum normal (18).

Fractions cellulaires

Deux types de fractions ont été préparés :

- fraction soluble et insoluble : les cellules dissociées, lavées et broyées à l'ultraturrax ont été centrifugées, 10 mn à 5000 tours/minute, pour éliminer les cellules entières et les gros fragments. Puis le surnageant a été centrifugé à 105.000g pendant 60 minutes. On obtient un surnageant, fraction soluble, et un culot, fraction insoluble.
- Extrait de membrane : des extraits de membrane ont été préparés en traitant les cellules par des tampons de force ionique faible, puis solubilisés par la papaine, selon la méthode décrite par

Davies pour la préparation d'antigènes d'histocompatibilité (100).

Les différentes fractions ont été lyophilisées, et le contenu en protéines dosé par la méthode du Biuret.

Absorption des antisérums

Les antisérums ont été absorbés :

- Soit avec des cellules : 0,1 ml d'antisérum est incubé avec le culot de cellules pendant 30 minutes à 37°C. Des quantités différentes de cellules ont été utilisées. Après centrifugation, le test d'immunofluorescence est fait avec 0,05 ml du surnageant
- Soit avec des fractions de cellules : la poudre lyophilisée est dissoute en remise en suspension dans 0,1 ml d'antisérum. Après incubation de 30 minutes à 37°C et centrifugation, le test est fait avec le surnageant.

Isolement des anticorps

Les anticorps fixés sur les cellules tumorales, après incubation avec l'antisérum et lavage des cellules, ont été éluées selon la technique de Motet et Bergheden (101), à l'aide d'un tampon Glycine-HCl pH 2,6, 0,2 M. Le produit de l'élution a été dialysé contre du tampon physiologique, et reconcentré à la moitié du volume initial de l'antisérum utilisé.

L'éluat a été testé par immunofluorescence de membrane pour y rechercher des anticorps, et par double diffusion en gélose avec des antisérums spécifiques des différentes immunoglobulines de souris pour identifier les protéines présentes dans l'éluat.

Cytotoxicité

Selon la méthode de Gorer et O'Gorman (28)), le test a été fait avec une suspension de cellules préparée de la même façon que pour le test d'immunofluorescence de membrane. Chaque tube contenant 0,05 ml d'une suspension de cellules à 2.10^6 par ml (10^5c. par tube), 0,05 ml de sérum immun à des dilutions au 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16 et 0,05 ml de complément est incubé 1 heure à 37°C, 2 gouttes de solution de Bleu Trypan sont ajoutées, et les cellules sont comptées à l'hématimètre.

Plusieurs sources de complément ont été essayées : le complément lyophilisé de cobaye de l'Institut Pasteur, du sérum frais de cobaye dilué au 1/2, du sérum frais de rat dilué au 1/2. Dans chaque test a été inclus un témoin positif, sérum de rat anti tumeur à plasmocytes de souris BALB/c, et un témoin négatif, sérum de souris normales.

L'indice de cytotoxicité a été calculé comme le pourcentage de cellules non colorées après incubation avec le sérum témoin, moins le pourcentage de cellules non colorées après incubation avec l'immunsérum, divisé par le premier de ces facteurs.

TECHNIQUE DES MICROPLAQUES

C'est une technique d'étude de la cytotoxicité liée aux cellules vis à vis de cellules cibles en culture (58). Le test est fait dans des microplaques stériles Falcon n° 3034, chaque plaque contient 60 réservoirs, d'une capacité un peu supérieure à 10 µl. La distribution des réactifs est faite à l'aide d'une seringue Hamilton équipée d'un dispositif de distribution automatique.

- Les cellules cibles

Les cellules tumorales provenant de la tumeur A3 ont été utilisées après mise en culture récente, après 1 ou 2 passages, en milieu MH avec 20 % de sérum de veau foetal et antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine) ; les lavages et incubations sont faits avec ce même milieu. 100 ou 200 cellules, dans un volume de 10 µl sont distribués dans chacun des réservoirs. Les plaques sont incubées à 37°C, dans une atmosphère contenant 5 % de CO_2, pendant 24 heures. Puis elles sont rincées avec du milieu MH, afin d'éliminer les débris et les cellules non adhérentes, et les cellules lymphoïdes sont ajoutées.

- Les cellules lymphoïdes

Deux sortes de cellules ont été testées, les cellules spléniques et les cellules péritonéales. Elles proviennent d'animaux immunisés de la même façon que pour l'étude de l'immunité in vivo et des anticorps humoraux. Chaque test comporte des témoins, avec des cellules provenant d'animaux non immunisés, préparées de la même façon.

Les rates sont prélevées aseptiquement, coupées aux ciseaux et passées à travers un tamis. La suspension est lavée 3 fois, comptée et ajustée à la concentration désirée.

Les cellules péritonéales sont obtenues par rinçage de la cavité péritonéale, lavées, comptées et ajustées.

Dans chaque test, plusieurs quantités différentes de lymphocytes ont été déposées dans les réservoirs, pour les cellules immunes et pour les cellules non immunes : pour les cellules spléniques, réservoirs contenant 250 et 500 fois plus de cellules lymphoïdes que de cellules tumorales, pour les cellules péritonéales 50 et 100 fois plus. Douze réservoirs au minimum sont remplis de façon identique.

Les plaques sont incubées à nouveau à 37°, en 5 % de CO_2, et 48 heures plus tard lavées 3 à 4 fois avec du milieu MH sans sérum, puis fixées par l'alcool méthylique 30 minutes et colorées par le May-Grunwald-Giemsa.

Les cellules sont comptées, dans chaque réservoir, avec un microscope inversé, à l'aide d'un micromètre. La moyenne des cellules comptées dans les réservoirs remplis de façon identique est calculée, et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin.

INHIBITION DE MIGRATION DES MACROPHAGES

On a apprécié par cette technique la migration de macrophages d'origine péritonéale ou splénique, en présence de l'antigène (cellules tumorales) et de lymphocytes provenant de la rate d'animaux immunisés.

- Les cellules péritonéales

L'exsudat péritonéal est induit par injection in situ de 3 ml de Trioléine 1 % en solution de Hanks. 4 jours plus tard, les cellules sont recueillies par lavage péritonéal avec du milieu de Hanks hépariné. Les cellules sont lavées 3 fois par centrifugation en milieu MH.

- Les cellules lymphoïdes sont recueillies à partir de la rate d'animaux normaux ou immunisés. Après ablation septique, la rate e est coupée avec des ciseaux, et les fragments passés à travers un tamis. La suspension de cellules est débarrassée des globules rouges par choc osmotique, 20 secondes dans une solution saline à 3 g/l. Les cellules sont lavées 3 fois en solution de Hanks, et resuspendues en milieu nutritif (MH + Sérum de veau 10 %) à la densité cellulaire désirée.

- Les cellules tumorales provenant de la tumeur A_3 ont été utilisées sous 3 formes :

- à partir de la tumeur solide, coupée et passée à travers un tamis
- à partir de la forme ascitique, les cellules sont recueillies par ponction.
- à partir des cellules cultivées in vitro en milieu MH + 10 % de sérum de veau. Les cellules sont recueillies par trypsination.

Les cellules sont lavées 3 fois et suspendues en milieu sans sérum.

Les cellules ascitiques provenant de tumeurs d'autre origine : Gil 10, EK1, EL 4, ont été utilisées comme témoins.

- Le test de migration est fait dans une chambre de migration préparée de la façon suivante ; une couche d'Agar à 1 % en milieu MH stérile, de 5 mm d'épaisseur, est coulée dans une boite de Pétri Falcon de 50 mm de diamètre. Un réservoir de 20 mm de diamètre est découpé avec un emporte pièce dans chaque boite.

- les suspensions de cellules

Pour la migration des macrophages d'origine péritonéale, elles contiennent 20.10^6 cellules péritonéales/ml

+ 10.10^6 cellules spléniques/ml

+ 5.10^6 cellules tumorales/ml

Pour la migration des cellules spléniques, elles contiennent

30.10^6 cellules spléniques/ml

+ 5.10^6 cellules tumorales/ml

- Les tubes capillaires

Les suspensions sont aspirées par capillarité dans des tubes à microhématocrite héparinés stériles. Une extrémité est fermée à la pate à modeler stérile. Les tubes sont placés dans un tube large et centrifugés 3 minutes à 500 tours/minute, puis cassés

à l'interface entre cellules centrifugées et surnageant. Les extrémités contenant les cellules sont placées dans les chambres et poussées doucement dans la couche d'agar, de telle sorte que le capillaire est maintenu en place sur la surface plastique de la boite de Pétri. Trois tubes capillaires sont placés dans chaque chambre. La chambre est remplie avec 1,5 ml de milieu nutritif, fermée avec une lamelle, et le couvercle est posé sur la boite de Pétri.

Les chambres sont incubées 18 heures à 37°C, en atmosphère contenant 5 % de CO_2. Après 18 heures, les cellules ont migré du tube capillaire sur la surface plastique de la boite. Une image de l'aire de migration est projetée sur un papier. L'image est découpée et pesée. On calcule la moyenne des poids des tests identiques.

Les résultats sont exprimés en index de migration :

$$100 \times \frac{\text{Moyenne des tests}}{\text{Moyenne des controles}}$$

- Facteur de migration

Le facteur est recherché dans le surnageant d'incubation : cellules tumorales-cellules lymphoïdes. Son activité est testée sur la migration des macrophages.

20.10^6 cellules immunes ou non immunes sont incubées pendant 24 heures avec 3.10^6 cellules tumorales. Le surnageant est recueilli, centrifugé 15 minutes à 3 000 tours/minute, et passé sur filtre Millipore 0,22µ. Le surnageant est utilisé pour suspendre les cellules mises à migrer, et pour remplir la chambre de migration.

Transfert passif

Un groupe d'animaux a été immunisé avec la tumeur A_1, selon les modalités de la 4ème série (tableau II). Un mois après la fin des injections, les animaux ont été sacrifiés, le sérum recueilli, et à partir de la rate a été préparée une suspension de cellules par dissociation mécanique.

Plusieurs groupes de 10 animaux chacun ont reçu :
- les uns les cellules de la rate, 25.10^6 cellules par voie sous-cutanée par animal.
- d'autres, 0,1 ml de sérum par voie sous-cutanée.

En même temps, 2 groupes d'animaux témoins ont reçu respectivement du sérum ou des cellules de rate provenant d'animaux non immunisés, par la même voie et à la même dose.

Le même jour tous ces animaux ont reçu une injection sous cutanée de 5.10^5 cellules de la tumeur A_1.

Dans une deuxième série d'expérience, le même protocole a été observé, mais au lieu de cellules de la rate, on a inoculé des cellules péritonéales, recueillies par lavage du péritoine, à raison de 5.10^6 cellules par animal.

Corrélation anticorps-résistance

- Expérience directe : 22 animaux immunisés selon les modalités de la 4ème série (tableau II) ont été saignés, leur sérum testé individuellement par le test d'immunofluorescence de membrane, le même jour, la tumeur à été greffée, et son développement a été suivi.

- Expérience par transfert passif : un groupe de souris a été immunisé selon les modalités de la 4ème série (tableau II). Les animaux ont été saignés 2 semaines après la fin des injections, les sérums réunis ont été testés par le test d'immunofluorescence de membrane, et d'autre part injectés à des animaux en même temps qu'était greffée la tumeur, selon les mêmes modalités que pour les expériences de transfert passif.

Les mêmes animaux immunisés ont été à nouveau saignés 2 semaines plus tard, et 2 semaines encore plus tard, soit respectivement 4 et 6 semaines après la fin de l'immunisation, chaque fois les sérums ont été testés de la même façon, par le test d'immunofluorescence de membrane et par transfert passif.

Culture des plasmocytes in vitro

La tumeur A3 a été mise en culture selon la technique de Paraf et Coll (102). La tumeur est découpée en petits fragments, soigneusement lavés en tampon physiologique et incubés sous agitation douce dans une solution de trypsine à 0,25 %, à 37°C pendant 5 minutes. La suspension ainsi obtenue est centrifugée, remise dans le milieu de culture, et passée en flacons plastique Falcon, à raison de 3.10^6 cellules par flacon. Les fragments sont remis en suspension dans une solution de trypsine fraiche, et incubés 60 minutes. La deuxième suspension de cellules est mise en culture de la même façon.

Lors des premiers passages, les cellules ont été cultivées en milieu de ELY, additionné de 20 % de sérum de veau, 2 % de vitamines, 5 % d'extrait embryonnaire de souris et 1 % d'antibiotiques (Penicilline, Streptomycine). Puis elles ont été cultivées en milieu de Eagle, additionné de 10 % de sérum de veau, 1 % de vitamines et 1 % d'antibiotiques.

Pour les immunisations d'animaux et les tests d'immunofluorescence, les cellules sont remises en suspension par incubation dans la solution de trypsine, 5 minutes à 37°C, et lavées 3 fois dans le tampon physiologique. Les immunisations et les tests d'immunofluorescence ont été faits de la même façon qu'avec les cellules provenant de tumeurs.

RESULTATS

I - INDUCTION D'UNE RESISTANCE A LA GREFFE TUMORALE

IMMUNISATION AVEC DES METHODES AUTRES QUE L'IODOACETATE DE SODIUM

Plusieurs méthodes ont été décrites pour induire une résistance à la greffe tumorale, par immunisation avec des cellules viables, modifiées ou non. Les méthodes les plus souvent utilisées ont d'abord été essayées :

- Injections multiples de cellules non modifiées, à une dose inférieure à celle qui entraîne un développement tumoral.

- Avec des cellules irradiées à 6.000 r; en injections multiples.

Après immunisation, les animaux ont reçu la greffe tumorale, ainsi que des animaux témoins, n'ayant reçu aucun traitement.

Puis le nombre d'animaux développant une tumeur au cours des 3 mois suivant la greffe tumorale a été noté, ainsi que le temps s'écoulant entre la greffe et la mort, la moyenne pour ce temps étant calculée pour chaque groupe. Chacune de ces techniques a été essayée avec deux lignées tulorales, E8 et E2.

Les animaux traités ont développé des tumeurs dans la

même proportion que les animaux témoins, le temps moyen de survie est un peu plus long chez les animaux traités mais sans que les différences soient statistiquement significatives.

Une troisième technique a alors été essayée, après inoculation de la tumeur, on laisse celle-ci se développer, puis on injecte un antimitotique puissant, le N-N di 2 chloroéthyl-aniline (CB 1074), qui entraîne une régression de la tumeur. Quand la tumeur a régressé, on leur réinjecte la même tumeur. Cette tumeur a été en même temps inoculée à deux groupes d'animaux témoins, les uns n'ayant reçu aucun traitement, les autres ayant reçu comme traitement préalable une injection de CB 1074. Les mêmes lignées tumorales, E8 et E2, ont été utilisées, Les résultats ont été là aussi très décevants, comparables à ceux obtenus avec les techniques précédentes. Les résultats sont indiqués dans le tableau III

IMMUNISATION AVEC DES CELLULES INCUBEES DANS L'IODOACETATE DE SODIUM

Les premiers essais ayant donné des résultats intéressants, c'est avec cette méthode qu'ont été poursuivies toutes les expériences ultérieures.

TABLEAU III

IMMUNISATION AVEC DES METHODES AUTRES QUE L'IODOACETATE DE SODIUM

Type de traitement	Immunisation	Tumeur greffée	Tumeurs développées		Temps moyen de survie
Cellules non modifiées	-	E_8	20/20	100 %	51 jours
	E_8	E_8	19/19	100 %	59 jours
	-	E_2	18/20	90 %	45 jours
	E_2	E_2	17/20	85 %	55 jours
Cellules irradiées	-	E_8	18/20	90 %	52 jours
	E_8	E_8	20/20	100 %	58 jours
	-	E_2	16/19	84 %	47 jours
	E_2	E_2	17/20	85 %	52 jours
Antimitotique	-	E_8	10/10	100 %	54 jours
	*CB1074	E_8	10/10	100 %	58 jours
	E_8-CB1074	E_8	9/10	90 %	66 jours
	-	E_2	10/10	100 %	47 jours
	CB1074	E_2	9/10	90 %	51 jours
	E_2-CB1074	E_2	10/10	100 %	57 jours

* ou N-N di 2 chloroethylaniline.

Résistance vis à vis de la tumeur utilisée pour l'immunisation

a) Suivant le mode d'immunisation

3 séries ont été faites : dans la 1ère série, les souris ont été immunisées selon la 1ère modalité du tableau I (Matériel et méthodes) par 3 injections sous-cutanées. Dans la 2ème série, elles ont été immunisées selon la 2ème modalité avec de l'adjuvant complet de Freund incorporé aux cellules lors de la 1ère injection. Dans la 3ème série, elles ont été immunisées selon la 3ème modalité, sans adjuvant, en alternant les injections par voie sous-cutanée et intra péritonéale, en augmentant le nombre d'injections et le nombre de cellules injectées.

Deux semaines après la fin de l'immunisation, les animaux traités, ainsi que les témoins ont reçu 5.10^5 cellules tumorales par voie sous-cutanée. Pour les 4 lignées tumorales utilisées dans cette série d'expériences, cette dose donne chez les témoins un pourcentage élevé de prise de tumeur, 60 à 100 % avec des différences statistiquement non significatives, d'une série à l'autre pour la même lignée, et d'une lignée à une autre lignée.

Le tableau IV rassemble les résultats des 1ère et 2ème séries, ainsi que la partie de la 3ème série concernant l'immunisation avec la tumeur homologue.

TABLEAU IV

IMMUNISATION AVEC LES TUMEURS HOMOLOGUES

Immunisation / Tumeur test	— (+)	Rate normale	E_8		A_1		K_{10}		E_8	
			I	II						
1ère série										
E_8	10/10		15/30	5/15						
	100%		50%	33%						
					I	II				
A_1	7/10				9/29	5/20				
	70%				31%	25%				
							I	II		
K_{10}	10/10						12/29	2/17		
	100%						41%	12%		
			I	II						
2e série										
E_8	18/20	14/18	4/17	3/13						
	90%	78%	23%	23%						
					I	II				
A_1	15/20	13/17			5/19	3/14				
	75%	76%			26%	21%				
									I	II
E_8	16/20	14/20							7/20	4/13
	80%	70%							35%	31%
									I	II
3e série										
E_8	16/20	13/20							12/38	4/26
	80%	68%							32%	15%
					I	II				
A_1	12/18	13/18			5/36	5/31				
	68%	72%			14%	16%				
							I	II		
K_{10}	15/20	12/18					3/38	4/35		
	75%	68%					8%	12%		

Rapport entre le nombre d'animaux ayant présenté une tumeur et le nombre total d'animaux.

I. Première greffe tumorale

II. Deuxième greffe faite chez les animaux ayant résisté à la première.

Les 2 types de témoins, animaux n'ayant rien reçu avant la greffe tumorale et animaux ayant reçu des injections de cellules de rate normale incubées dans l'iodoacétate de sodium ont développé des tumeurs dans la même proportion. Les différences observées entre ces deux groupes de témoins ne sont statistiquement pas significatives.

Les animaux prétraités avec des cellules tumorales modifiées ont présenté, après injection de cellules malignes, des tumeurs dans un pourcentage de cas beaucoup plus faible que les témoins. Mais dans tous les groupes, un certain nombre d'animaux immunisés ont développé une tumeur, dans une proportion allant de 8 % (K10 dans la 3ème série) à 50 % (E2, 1ère série).

L'addition d'adjuvant de Freund complet aux cellules traitées par l'iodoacétate de sodium ne modifie pas le degré de résistance, comme le montrent les résultats comparables entre la 1ère série dans laquelle les animaux n'ont pas reçu d'adjuvant, et la 2ème série dans laquelle, pour la 1ère injection, les cellules ont été incorporées à l'adjuvant complet de Freund.

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'importance de la résistance et le type de paraprotéine synthétisé par la tumeur (IgA pour E8 et AI, IgG_2 pour E2 et K10).

Les animaux n'ayant pas présenté de tumeur après la lère greffe ont reçu une 2ème greffe. Quelques animaux dans chaque groupe ont développé une tumeur, avec une fréquence variable voisine de celle observée après la lère greffe.

b) En fonction de la longueur de l'immunisation

Des animaux immunisés avec la tumeur AI selon la 3ème modalité ont été divisés en 2 groupes : l'un a reçu la greffe tumorale, l'autre a reçu une 2ème série d'injections immunisantes identique à la lère, puis la greffe tumorale (tableau V). On voit que dans ces 2 groupes d'animaux, le degré de résistance est le même.

c) En fonction du temps écoulé entre la fin de l'immunisation et la greffe tumorale

Des animaux immunisés avec la tumeur AI selon la 3ème modalité ont été divisés en 4 lots : le ler a reçu une greffe une semaine après la fin des injections, le 2ème 2 semaines, le 3ème 4 semaines et le 4ème 8 semaines après la fin des injections (tableau VI).

C'est à 2 et 4 semaines que l'on trouve la meilleure résistance, celle-ci étant faible ou inexistante à 1 et à 8 semaines. Ceci montre que la greffe ne doit se faire ni trop tôt ni trop tard, mais que la marge est assez grande.

TABLEAU V

RESISTANCE EN FONCTION DE LA LONGUEUR DE L'IMMUNISATION

	Immunisation	Tumeurs développées	
1 série d'injections	-	16/20	80 %
	A_1	4/16	25 %
2 séries d'injections	-	14/16	83 %
	A_1	3/16	19 %

TABLEAU VI

RESISTANCE EN FONCTION DU TEMPS ECOULE ENTRE LA FIN DE L'IMMUNISATION ET LA GREFFE TUMORALE

Intervalle	Immunisation	Tumeurs développées	
1 semaine	-	16/18	89 %
	rate normale	16/20	80 %
	A_1	12/20	60 %
2 semaines	-	17/20	85 %
	rate normale	13/20	81 %
	A_1	5/20	25 %
4 semaines	-	15/20	75 %
	rate normale	15/18	83 %
	A_1	5/18	28 %
8 semaines	-	15/20	75 %
	rate normale	19/20	95 %
	A_1	10/20	50 %

Immunisations croisées

Des animaux ont été immunisés avec une tumeur, puis ont reçu une greffe provenant d'une autre lignée tumorale. Trois lignées tumorales ont été étudiées : AI, E8 et K1O. Les résultats sont réunis dans le tableau VII.

On trouve une résistance croisée entre les tumeurs AI et E8. En effet, les animaux présentent le même degré de résistance vis à vis de la tumeur AI, qu'ils aient été immunisés avec AI ou E8. Réciproquement, qu'ils aient été immunisés avec AI ou E8, ils présentent le même degré de résistance vis à vis de la tumeur E8.

Par contre, il n'y a pas de réaction croisée entre K1O d'une part, AI et E8 d'autre part. Les animaux immunisés avec la tumeur K1O et greffés avec la tumeur AI ou la tumeur E8 développent des tumeurs dans la même proportion que des animaux non immunisés. Les animaux immunisés soit avec AI soit avec E8 ne présentent pas de résistance vis à vis de la greffe de la tumeur K1O. Les différences avec les animaux témoins ne sont pas significatives.

TABLEAU VII

IMMUNISATIONS CROISEES

Immunisation / Tumeur test	— (+)	Rate normale	E_8	A_1	K_{10}
E_8	16/20 80%	13/20 68%	12/38 32%	← NS → 5/19 26%	12/20 60%
			*		
	NS				
A_1	12/18 68%	13/18 72%	3/16 19%	← NS → 5/36 14%	8/18 44%
			**		
	NS				
K_{10}	15/20 75%	12/18 68%	8/18 44%	← NS → 9/21 43%	3/38 8%
			**		
	NS				

N.S. Ne diffèrent pas significativement entre eux.

* Différent au risque de 5 %

** Différent au risque de 2 %

(test de comparaison des pourcentages par le X^2 de Pearson)

3ème série d'immunisation, pour l'étude des réactions croisées

(+) Pas d'immunisation

On peut donc obtenir, par immunisation des souris avec des cellules tumorales incubées dans l'iodoacétate de sodium une résistance au développement tumoral qui n'avait pas pu être obtenue par d'autres méthodes.

Les autres techniques utilisées n'étaient peut-être pas efficaces :

- les cellules non modifiées ne peuvent être inoculées qu'en petite quantité pour immuniser, sinon on obtient le développement d'une tumeur.
- les cellules irradiées perdent parfois leur antigénicité.
- l'antimitotique injecté était peut-être toxique pour les cellules immunologiquement compétentes.

L'iodoacétate de sodium a peut-être aussi une action par lui-même ; pour Appfel et coll, l'alkylation des groupes thiol, modifiant la surface des cellules, pourrait permettre à une antigénicité discrète de s'exprimer, peut-être en stabilisant les antigènes de surface.

Le niveau de résistance semble à peu près le même avec les différentes modalités d'immunisation essayées : addition ou non d'adjuvant de Freund, plus ou moins longue immunisation, voie uniquement sous-cutanée ou associée à la voie intrapéritonéale.

Les animaux immunisés développent moins de tumeurs si on fait la greffe 2 à 4 semaines après la fin de l'immunisation que si on la fait plus tôt ou plus tard.

II - ANTICORPS HUMORAUX CHEZ LES SOURIS IMMUNISEES

TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE DE MEMBRANE

On détecte par ce test les anticorps sériques capables de se fixer à la surface des cellules tumorales. L'image fluorescente, à la périphérie de la cellule, apparaît tantôt très fine, faite de petits points juxtaposés, tantôt plus épaisse, uniquement ou prédominant en certaines régions : elle n'est pratiquement jamais continue. Les cellules témoins, c'est à dire incubées dans un sérum de souris non immunisées, ne doivent en principe pas apparaître colorées. Cependant, il est fréquent qu'un petit nombre d'entre elles le soient (0 à 5 % dans nos expériences). L'indice de fluorescence se calcule en établissant une correction en fonction du témoin. Il est difficile de fixer une limite précise à la positivité d'un sérum. On admet qu'un sérum est positif pour un indice de fluorescence supérieur ou égal à 0,2 ou 0,3 selon les auteurs.

Les souris ont été immunisées selon la 4ème modalité du tableau I (matériel et méthodes) et testées après une série d'immunisations de 3 semaines, puis après une 2ème série identique à la 1ère, avec un intervalle de 6 semaines entre les 2 séries.

Anticorps vis à vis de la tumeur utilisée pour l'immunisation (tableau VIII).

Les indices de fluorescence des sérums de souris testés individuellement montrent qu'il existe une assez grande variabilité d'un sérum à l'autre, pour des animaux immunisés ensemble, de la même façon, et testés ensemble, à l'aide de la même suspension de cellules.

Après une seule série d'immunisation, l'indice s'élève en 2 à 3 semaines, et redescent assez rapidement, en 5 à 6 semaines. Après une 2ème série d'immunisation, le taux atteint des chiffres plus élevés, et les anticorps persistent plus longtemps, souvent encore à un taux élevé, au bout de 8 semaines. On observe assez souvent une diminution du taux des anticorps, 3 à 4 semaines après la fin de l'immunisation, suivie d'une remontée.

Les taux maximum atteints chez les animaux hyperimmunisés, de 0,50 à 0,80 selon les animaux, sont comparables pour les 4 lignées étudiées, mais c'est avec les lignées A2 et A7 que l'on trouve le plus souvent des taux élevés.

Des sérums ont été testés parallèlement avec une suspension de cellules préparées selon la méthode usuelle, et une suspension préparée sans trypsine, en dissociant les cellules en tampon citrate. Ceci a été fait pour vérifier que la

TABLEAU VIII

TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE DE MEMBRANE AVEC DES SERUMS INDIVIDUELS DE SOURIS IMMUNISEES

Tumeur immunisante et source de cellules cibles	INDICE DE FLUORESCENCE								
	I Semaines					II Semaines			
	2	3	4	5	6	2	3	4	6
A_1	0,04		0,05	0,27	0,10	0,19	0,71	0,65	0,25
	0,05	0,31	o,33	0,42	o,03	0,60	0,65	0,59	0,44
	0	0,34	0,25	0,55	0,03	0,30	0,64	0,55	0,25
	0,02	0,04	0,08	0,46	0,26	0,02	0,74	0,43	0,53
	0,14	0,44	0,16	0,35	0,15		0,64	0,53	0,91
Moyenne	0,05	0,28	0,17	0,49	0,11	0,28	0,68	0,51	0,48
	2	3	4	5	6	2	3	4	6
A_7	0,62	0,75	0,31	0,25	0,09	0,55		0,17	0,82
	0,41	0,41	0,36	0,15	0,10	0,82		0,20	0,73
	0,59	0,66	0,52	0,13	0,08	0,88		0	0,59
	0,43	0,24	0,35	0,35	0,32	0,27		0	0,76
	0,16	0,50	0,46			0,44		0,11	0,74
Moyenne	0,44	0,51	0,40	0,22	0,15	0,59		0,09	0,73

TABLEAU VIII (suite)

A_3	2	3	4	5	6	2	3	4	6	8
A_3	0,28	0,52	0,20	0,52	0,53	0,41	0,65	0,54	0,71	0,59
	0,06	0,28	0,13	0,17	0	0,48	0,05			
	0,10		0,10	0	0	0,37	0,02	0,37	0,49	
	0,08	0	0,19		0	0,18	0,05	0,60	0,58	
	0,45	0,51	0,27	0	0,07	0,74	0,06	0,70	0,76	
Moyenne	0,19	0,33	0,18	0,17	0,12	0,44	0,17	0,55	0,63	0,59
A_2	2	3	4	5	6	2	3	4	6	8
A_2	0,50	0,52	0,44	0,35	0,06	0,76	0,52	0,80	0,99	
	0,49	0,51	0,50	0,21	0,18	0,48	0,31	0,52	0,52	0,54
	0,40	0,46	0,34	0,24	0,08	0,22	0,35	0,57	0,66	0,62
	0,59	0,71	0,57	0,76	0,39	0,74	0,52	0,87	0,69	
	0,29	0,37	0,10	0,65	0,19	0,11	0,15	0,48	0,75	
Moyenne	0,45	0,51	0,39	0,44	0,18	0,46	0,37	0,65	0,72	0,58

I - Les souris ont été saignées 2, 3, 4, 5 et 6 semaines après la fin d'une série d'injections immunisante.

II - Les mêmes souris ont été saignées 2, 3, 4, 6 et 8 semaines après une 2ème série d'injections identique à la première après un intervalle de o semaines.

trypsine n'entraîne pas de modification importante de la surface des cellules. La préparation en tampon citrate donne une assez bonne suspension, mais avec davantage de cellules mortes, et un moins bon rendement qu'avec le tampon physiologique additionné de trypsine. Pour les 6 sérums testés, la différence d'indice a été très faible, inférieure à 0,10. La trypsine ne semble donc pas modifier les antigènes en cause.

Le sérum d'animaux porteurs de tumeur a été testé. Les souris non immunisées au préalable ont reçu la greffe tumorale par voie sous cutanée à l'aide d'un trocard. Des animaux ont été saignés à des intervalles différents après la transplantation, alors qu'ils étaient porteurs d'une tumeur palpable. Les indices de fluorescence de ces sérums ont toujours été très faibles, inférieurs ou égaux à 0,15 (tableau IX).

Réactions croisées (tableau X) entre plusieurs lignées de plasmocytosarcomes.

Ont été testés soit des sérums individuels, soit des pools de serums de souris immunisées et saignées en même temps, présentant un indice de fluorescence au moins égal à 0,40 avec la tumeur homologue.

TABLEAU IX

RECHERCHE D'ANTICORPS PAR LE TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE DE MEMBRANE DANS LE SERUM DE SOURIS PORTEUSES DE TUMEURS

Tumeur	Temps écoulé entre la greffe et la saignée	Indice de fluorescence
A_1	2 semaines	0,08
	3 semaines	0
	4 semaines	0
	5 semaines	0,08
A_2	2 semaines	0,01
	3 semaines	0
	5 semaines	0,15
	8 semaines	0
A_3	3 semaines	0,11
	4 semaines	0
A_7	2 semaines	0
	3 semaines	0,02
	4 semaines	0
	5 semaines	0

TABLEAU X

TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE DE MEMBRANE - REACTIONS CROISEES ENTRE PLUSIEURS LIGNEES DE TUMEURS A PLASMOCYTES

Immunserum antitumeur	Immunisation	Indices de fluorescence avec les cellules cibles de la tumeur : A_1	A_2	A_3	A_7
A_1	6 x 2.10^5C	0,54	0,15	0	
	12 x 2.10^5C	0,60	0,27	0,56	
		0,55		0,06	
		0,91		0,24	
A_2	6 x 2.10^5C	0,05	0,71		
			0,54		0,35
	12 x 2.10^5C	0,39	0,76	0,28	
		0,09	0,48	0,04	
			0,52	0	0,64
A_3	6 x 2.10^5C	0,19	0,15	0,53	
				0,54	0
	12 x 2.10^5C	0,16	0,12	0,70	
				0,59	0,66
		0		0,58	
A_7	6 x 2.10^5C	0,16			0,66
			0,36		0,65
				0,06	0,65
	12 x 2.10^5C	0,30			0,82

Les sérums des animaux saignés 2 à 6 semaines après une seule série d'injections de 3 semaines ne présentent en général pas de réaction croisée avec les cellules des autres lignées tumorales. Il y a cependant une exception, les sérums anti A7 réagissent fortement avec les cellules de la lignée A2.

Le sérum des animaux saignés 2 à 6 semaines après une deuxième série d'injections présentent des réactions croisées fréquentes.

D'une façon générale, plus les animaux ont reçu d'injections immunisantes, et plus les sérums réagissent fortement avec la tumeur homologue, plus les réactions croisées sont importantes. Le sérum présente le plus souvent un indice plus élevé avec la tumeur homologue, parfois comparable, très rarement plus élevé avec la tumeur hétérologue.

Des absorptions des antisérums ont été faites avec des cellules tumorales provenant de différentes lignées, puis testéesavec la tumeur homologue, pour rechercher les anticorps restant après absorption (tableau XI).

Les anticorps sont complètement absorbés par 5.10^7 cellules provenant de la tumeur homologue, par ml d'antisérum. Les anticorps ne sont pas absorbés avec le même nombre de cellules provenant d'une lignée avec laquelle l'antisérum n'a pas de réactivité croisée. Avec un antisérum anti A2, qui réagit avec les cellules provenant de la tumeur A2, et à un moindre degré avec A7, il y a une absorption partielle des anticorps dirigés

TABLEAU XI

EFFET DE L'ABSORPTION AVEC DES CELLULES TUMORALES SUR LE TEST D'IMMUNOFLUORESCENCE DE MEMBRANE

Immunserum antitumeur	Cellules utilisées pour l'absorption	Cellules cibles	Indice de fluorescence
A_7	—	A_7	0,65
	—	A_3	0,06
	A_7 5.10^7 C/ml	A_7	0
	A_3 5.10^7 C/ml	A_7	0,57
A_3	—	A_3	0,54
	—	A_7	0
	A_3 5.10^7 C/ml	A_3	0
	A_7 5.10^7 C/ml	A_3	0,53
A_2	—	A_2	0,54
	—	A_7	0,35
	A_2 5.10^7 C/ml	A_2	0,01
	A_7 5.10^7 C/ml	A_2	0,27
	A_7 10^8 C/ml	A_2	0,23
A_7	—	A_7	0,61
	—	A_2	0,36
	A_7 5.10^7 C/ml	A_7	0,05
	A_2 5.10^7 C/ml	A_7	0,05
	A_2 10^8 C/ml	A_7	0,23

contre A2 avec 5.10^7 cellules A7 par ml d'antisérum, et on n'obtient pas davantage d'absorption avec 10^8 cellules A7 par ml. Un résultat analogue est obtenu avec un antisérum anti A7 qui présente une réaction croisée avec les cellules A2.

Les anticorps sont donc absorbés complètement avec les cellules de la tumeur qui a été utilisée pour l'immunisation.

Ils ne sont pas absorbés avec des cellules provenant d'une tumeur avec laquelle ils ne présentent pas de réaction croisée. Ils sont absorbés partiellement avec des cellules provenant d'une tumeur avec laquelle ils présentent une réaction croisée partielle.

Elution des anticorps

Les anticorps fixés à la surface des cellules tumorales après incubation avec l'antisérum ont été isolés par élution avec un tampon acide, qui décroche les anticorps fixés et les fait repasser en solution.

L'isolement des anticorps fixés sur les cellules tumorales a été fait pour 2 tumeurs, AI et A2. L'antisérum a été incubé avec les cellules tumorales correspondantes. Il a été testé en fluorescence avant et après cette incubation. Avec la tumeur A2, l'antisérum présentait un indice de fluorescence de 0,54 avant incubation, de 0,14 après. Avec la tumeur AI l'antisérum anti AI avait un indice de 0,55 avant incubation, de 0,02 après. Les

anticorps ont donc bien été fixés sur les cellules.

Les anticorps élués, dialysés et reconcentrés à la moitié du volume initial de l'antisérum ont été testés en fluorescence avec les cellules tumorales homologues. La réaction a été négative.

Il est possible qu'une partie des anticorps ait été perdue au cours des manipulations. Mais plus probablement, ils ont été dénaturés au cours de l'élution qui se fait à pH acide. En effet, les éluats contenaient bien des immunoglobulines testés par double diffusion en gélose, vis à vis d'antisérums de lapin spécifiques pour les différentes immunoglobulines de souris (anti IgA, IgM, IgG_1 et IgG_2) on a obtenu une ligne de précipitation seulement avec l'anti IgG_2. La tumeur AI produisant une paraprotéine de type IgA, et la tumeur A2 une paraprotéine de type IgG_1, ce n'est pas la paraprotéine qui est détectée.

Les anticorps responsables de la réaction sont donc probablement de type IgG_2. S'il existe des anticorps d'autre type, ils ne sont pas décelés dans ces conditions, et l'immunoglobuline IgG_2 est de loin la plus abondante dans l'éluat.

Absorption des antisérums par des fractions cellulaires

Des antisérums anti A3 ont été testés avec des cellules A3, sans absorption et après absorption par différentes quantités de fractions cellulaires préparées à partir de la tumeur A3 :

- fraction soluble
- fraction insoluble
- extrait de membrane

Les résultats, indiqués dans le tableau12 montrent que les anticorps sont absorbés par la fraction cellulaire qui sédimente à 105.000 g, et par l'extrait de membrane. Ils ne sont pas absorbés par la fraction soluble.

Les antigènes correspondants ne sont pas présents sous forme soluble dans le cytoplasme, du moins en quantité décelable par la méthode utilisée. Il ne semble pas, en particulier, s'agir de la protéine de myélome, qui est présente en abondance dans cette fraction soluble.

Recherche de réactions croisées avec des tumeurs autres que les plasmocytosarcomes

Pour rechercher s'il existe une relation entre ces antigènes et anticorps détectés par immunofluorescence et d'autres systèmes déjà connus chez la souris, des antisérums anti plasmocytes ont été incubés avec des cellules provenant

TABLEAU XII

ABSORPTION DES ANTISERUMS ANTI A_3 PAR DES FRACTIONS CELLULAIRES

Fraction	Mg protéine par ml d'antisérum	Indice de Fluorescence Sérum 1	2	3	4
-	-	0,48	0,55	0,51	0,62
Soluble	3	0,43	0,51		
	6	0,47	0,52		
	12		0,48		
Insoluble	3	0,45	0,52		
	6	0,32	0,27		
	12		0,05		
Extrait de membranes	3			0,47	0,60
	6			0,25	0,43
	12				0,20

d'autres tumeurs, à raison de 10^8 cellules par ml d'antisérum, puis testés avec la tumeur à plasmocytes homologue.

Des antisérums anti AI, anti A2 et anti A3 ont été testés après absorption par des cellules tumorales provenant de tumeurs induites :

- par le virus de Gross : E KI
- par le virus de Rauscher : RC 19
- par le virus de Graffi : Gil 10

Après incubation avec des cellules provenant d'une de ces 3 tumeurs, on n'observe aucune diminution de l'indice de fluorescence de l'antisérum, alors qu'après incubation avec la même quantité de cellules provenant du plasmocytome homologue, on a une disparition complète des anticorps dans le sérum.

CYTOTOXICITE

Des antisérums ont été testés pour leur action cytotoxique, avec plusieurs sources de complément, Un sérum de rat anti tumeur à plasmocytes a été utilisé comme témoin positif, et s'est révélé fortement cytotoxique, alors que les différents sérums de souris testés étaient négatifs, qu'ils aient ou non un indice de fluorescence élevé.

ANTICORPS PRECIPITANTS

Des anticorps précipitants ont été recherchés dans le sérum des souris immunisées, vis à vis d'extraits de tumeur, par double diffusion en gélose et analyse immunoélectrophorétique. Ils ont été testés vis à vis d'extrait soluble total de tumeur, et vis à vis d'extrait de membrane solubilisé par la papaïne. Nous n'avons jamais trouvé d'anticorps précipitant.

On a donc pu mettre en évidence, dans le sérum des animaux immunisés, des anticorps vis à vis d'antigènes présents à la surface des cellules tumorales.

Ces antigènes de surface semblent multiples, les uns présents dans une seule des lignées tumorales étudiées, les autres dans plusieurs.

Ils sont différents de ceux liés aux tumeurs induites par le virus de Gross, et induites par les virus du groupe F.M.R.

III - IMMUNITE LIEE AUX CELLULES

Par 2 tests, test des microplaques et inhibition de migration des macrophages, on a étudié in vitro l'action des cellules lymphoïdes provenant d'animaux immunisés sur les cellules tumorales.

TEST DES MICROPLAQUES

Les cellules tumorales

Les cellules utilisées ont été des cellules mises en culture récemment, après un ou deux passages. Les cellules doivent bien adhérer à la surface plastique, afin de résister aux lavages, qui doivent être soigneux. Les cellules doivent être en nombre suffisant, mais pas trop nombreuses, pour être en bon état après incubation dans une très petite quantité de milieu. La dose de 100 cellules par réservoir, dans 10 µl de milieu nutritif, a été utilisée, ce qui laisse en moyenne 31 cellules par réservoir, au moment de la lecture, dans les réservoirs témoins sans addition de cellules lymphoides.

Les cellules cultivées depuis longtemps sont peu adhérentes, et nous avons renoncé à les utiliser, car elles supportent mal les lavages.

Après avoir laissé pendant 24 heures les cellules adhérer au support, les cellules lymphoïdes sont ajoutées. Des essais préliminaires ont montré qu'après une nouvelle incubation de 24 heures

avec les cellules lymphoïdes, on n'observe aucun effet. Une incubation de 3 jours entraîne des lésions non spécifiques des cellules tumorales, qui persistent en petit nombre et en mauvais état dans les réservoirs témoins. C'est donc une incubation de 48 heures qui paraît la plus favorable dans ce système.

L'action des cellules spléniques, et des cellules péritonéales a été testée sur ces cellules tumorales.

Les cellules spléniques

L'action des cellules provenant de la rate d'animaux immunisés a été testée sur les cellules tumorales ; plusieurs quantités de cellules spléniques ont été testées. C'est lorsqu'on met 250 ou 500 fois plus de cellules lymphoïdes que de cellules tumorales que l'on observe le meilleur effet. Quand on met moins de cellules, on observe en général peu d'effet. Si on en met davantage, on n'observe pas d'effet, et on a même parfois un petit effet stimulant.

Chaque test est comparé au test équivalent, fait avec des cellules spléniques provenant d'un animal non immunisé. Si l'on compare les réservoirs auxquels on a ajouté des cellules lymphoïdes normales aux réservoirs auxquels on n'a pas ajouté de cellules spléniques, pour une petite quantité de cellules spléniques, on a un effet stimulant sur les cellules tumorales ; pour de grandes quantités, on a un effet toxique non spécifique, du sans doute, à l'encombrement. C'est pourquoi il est nécessaire de comparer les tests avec des témoins contenant des cellules

normales en même quantité, et non pas avec des témoins sans cellules lymphoïdes ajoutées.

Les cellules lymphoïdes de la rate d'animaux immunisés pendant 3 semaines d'une part, pendant 5 semaines d'autre part, ont été testées. Tableau XIII.

Plus que la longueur de l'immunisation, c'est le délai après la fin de l'immunisation qui paraît important. C'est avec des cellules spléniques prélevées une semaine après la fin de l'immunisation que l'effet observé est le meilleur.

Les cellules péritonéales

Elles ont été déposées en plus faible quantité, 50 et 100 fois plus que de cellules tumorales. Elles ont été prélevées sur des animaux immunisés pendant 3 semaines. Tableau XIII. Les cellules péritonéales paraissent peu efficaces quand elles sont prélevées une semaine après la fin de l'immunisation, elles sont plus efficaces quand elles sont prélevées plus tardivement.

Fibroblastes d'embryon de souris

A titre de témoin, les cellules spléniques ont été testées sur des fibroblastes d'embryon de souris, à leur 2ème passage. Les cellules spléniques provenant d'animaux immunisés qui avaient un effet net sur les plasmocytes en culture, n'ont eu aucun effet sur ces fibroblastes non tumoraux.

TABLEAU XIII

TEST DES MICROPLAQUES. REDUCTION DES PLASMOCYTES TUMORAUX PAR DES CELLULES LYMPHOIDES DE SOURIS BALB/C ANTITUMEUR A3

Temps d'immunisation	Délai après la fin de l'immunis.	Cellules lymphoïdes	C. Lymph. / C. cibles	% de réduction	Probabilité
3 semaines	6 jours	péritonéales	50	- 22,6	NS
			100	- 21,6	NS
		rate	250	77,2	1 °/ooo
			500	69,2	1°/ooo
	8 jours	péritoneales	50	24,8	1 %
			100	41,2	1 °/ooo
		rate	250	49,6	1 °/ooo
			500	26,1	1 %
	11 jours	péritoneales	50	50,6	1 °/ooo
			100	55,3	1 °/ooo
		rate	250	- 8,0	NS
			500	- 0,6	NS
6 semaines	2 jours	rate	250	17,4	NS
			500	0	NS
	6 jours	rate	250	36,0	1 °/ooo
			500	51,8	1 °/ooo
	9 jours	rate	250	23,3	5 %
			500	42,9	1 °/ooo
	14 jours	rate	250	21,4	NS
			500	16,2	NS

Les cellules lymphoïdes de souris porteuses de tumeur (tableau XIV).

- une semaine après l'inoculation des cellules tumorales les cellules péritonéales sont peu efficaces, les cellules de la rate entraînent une réduction notable des cellules tumorales.

- deux semaines après l'inoculation des cellules tumorales alors qu'une petite tumeur est visible au point d'inoculation, les cellules péritonéales ont un effet discret, les cellules de la rate en ont peu.

Donc, aussi bien chez l'animal immunisé que chez l'animal porteur de tumeur:

- au bout de une semaine, les cellules de la rate paraissent plus efficaces
- plus tard, ce sont les cellules d'origine péritonéale qui paraissent plus efficaces.

Les premiers résultats des tests faits avec les cellules spléniques nous ont étonné, par la fugacité de l'action de ces cellules sur les cellules tumorales. Si elles sont prélevées 2 semaines après la fin de l'immunisation, elles semblent ne plus agir contre les cellules tumorales. Ceci est en désaccord avec ce que l'on observe in vivo. Par contre, à ce moment, les cellules péritonéales, qui étaient sans action à un stade plus précoce, deviennent actives. Il convient de faire cette étude sur une période plus prolongée, et d'étudier l'action combinée des deux sortes de cellules, spléniques et péritonéales.

TABLEAU XIV

TEST DES MICROPLAQUES . REDUCTION DES PLASMOCYTES TUMORAUX PAR DES CELLULES LYMPHOIDES DE SOURIS PORTEUSES DE TUMEUR A3

Tumeur inoculée depuis	Cellules lymphoïdes	C. Lymphoïdes / C. cibles	% de réduction	Probabilité
1 semaine	péritonéales	50	1,9	NS
		100	24,7	1 %
	rate	250	64,8	1 °/ooo
		500	67,7	1 °/ooo
2 semaines	péritonéales	50	36,4	1 °/oo
		100	36,3	1 %
	rate	250	21,4	NS
		500	21,5	NS

TEST D'INHIBITION DES MACROPHAGES

Migration des cellules péritonéales (tableau XV)

Quand les cellules péritonéales de souris normales sont en contact avec les cellules spléniques d'animaux immunisés et l'antigène correspondant, leur migration est spécifiquement inhibée. La moyenne de migration correspond à 60 % de celle des contrôles. La migration de macrophages provenant de souris immunisées est inhibée de façon comparable. L'inhibition, étudiée dans un système syngénéique a été comparée à celle obtenue dans un système allogénique : les lymphocytes provenant de souris C_3H et $C_{57}Bl$ immunisées contre la tumeur à plasmocytes de Balb/c provoquent une inhibition de migration comparable à celle obtenue avec les lymphocytes de Balb/c immunisées.

Il n'y a pas de réaction croisée avec des tumeurs d'autre origine, Gil 10 induite par le virus de Graffi, EK_1 induite par le virus de Gross, et EL_4 induite chimiquement.

Migration des cellules spléniques (tableau XVI)

La migration des cellules spléniques est inhibée dans les mêmes conditions que celle des macrophages péritonéaux. Les cellules spléniques migrent de façon régulière, et sont sensibles à l'inhibition.

Facteur de migration (tableau XVII)

L'activité de surnageant d'incubation : cellules spléniques immunes et cellules tumorales a été testée sur la migration des macrophages.

TABLEAU XV

INHIBITION DE MIGRATION DES CELLULES DE L'EXSUDAT PERITONEAL, EN PRESENCE DE LYMPHOCYTES IMMUNS, ANTI A3, ET DE CELLULES A3 SYSTEME SYNGENEIQUE, BALB/C ET ALLOGENIQUE, C_3H ET $C_{57}Bl$.

Lignées de souris immunisées	Tumeur (Forme)	Délai après immunisation (jours)	Pourcentage d'inhibition de migration	Probabilité
BALB/C	ascite	15	30 %	1 °/ooo
BALB/C	ascite	13	21	5 %
BALB/C	ascite	10	54	1 °/ooo
BALB/C	culture	10	47	5 %
BALB/C	culture	19	15	NS
BALB/C	ascite	19	80	1 %
BALB/C	solide	19	80	
C_3H	ascite	12	40	2 %
	ascite	11	42	1°/ooo
$C_{57}Bl$	ascite	12	35	1 %
	ascite	11	45	1 °/ooo

TABLEAU XVI

INHIBITION DE MIGRATION DES CELLULES SPLENIQUES. INHIBITION SPECIFIQUE EN PRESENCE DE CELLULES TUMORALES A_3. ABSENCE D'INHIBITION EN PRESENCE DE CELLULES TUMORALES DIFFERENTES

Cellules tumorales testées	Délai après immunisation (jours)	Pourcentage d'inhibition de migration	Probabilité
A_3 culture	13	35 %	1 °/ooo
A_3 ascite	13	27 %	1 %
A_3 ascite	5	50	1 %
EL4		- 60	1 %
Gil		- 2	NS
EK_1		- 10	NS

TABLEAU XVII

MIGRATION DE CELLULES PERITONEALES ET SPLENIQUES.
INHIBITION PAR L'INTERMEDIAIRE DU MILIEU D'INCUBATION DE LYMPHOCYT
EN PRESENCE DE CELLULES TUMORALES LA_3

Origine des cellules migratrices	Pourcentage d'inhibition de migration	Probabilité
Cellules péritonéales	44 %	1 °/ooo
	42 %	1 %
Cellules spléniques	70 %	1 %
	89 %	1 °/ooo

Deux sortes de contrôles ont été faits : surnageant de cellules tumorales seules, et surnageant d'incubation de cellules tumorales et de lymphocytes non immuns. Dans ces contrôles, la migration est plus faible que celle obtenue dans du milieu frais de 15 %. Le surnageant est donc un peu toxique, de façon non spécifique.

Le surnageant d'incubation-lymphocytes immuns-cellules tumorales inhibe spécifiquement la migration de cellules péritonéales provenant d'animaux immuns ou non immuns. L'inhibition obtenue est beaucoup plus forte, si on ajoute ce surnageant à des cellules spléniques provenant d'animaux immuns, qu'à des cellules spléniques normales.

Forme de l'antigène

L'antigène, c'est-à-dire les cellules tumorales, a été utilisé sous trois formes : cellules provenant de tumeurs solides, forme ascitique, et cellules cultivées in vitro. Une bonne réaction est obtenue avec chacune de ces trois formes, elles contiennent donc toutes trois le ou les antigènes de tumeur.

Ce test permet donc de détecter d'une part l'état immun des cellules lymphoides, d'autre part la présence d'antigènes de tumeur sur les cellules tumorales.

IV - MECANISME DE L'IMMUNITE

Les animaux immunisés à l'aide de cellules tumorales incubées dans l'iodoacétate de sodium présentent une résistance à la greffe tumorale et ils ont dans leur sérum des anticorps vis à vis de la surface des cellules. Les cellules spléniques et péritonéales, aboutissant à une lésion de ces cellules (micro-tests) et à la formation d'un facteur immobilisant les macrophages.

La résistance tumorale est-elle liée à la présence des anticorps sériques, ou à une immunité de type cellulaire, ou à l'action conjuguée des deux ?

Ce problème a été abordé d'une part par des expériences de transfert passif, en transférant à des animaux neufs soit des cellules immunologiquement compétentes, doit du sérum provenant d'animaux immunisés, puis en leur greffant la tumeur ; on peut observer si les anticorps ou les cellules immunes sont capables de conférer une immunité.

D'autre part, on a recherche s'il était possible d'établir une corrélation entre la résistance à la greffe tumorale et la quantité d'anticorps soit présents chez l'animal immunisé au moment de la greffe, soit transférés passivement lors de la greffe à des animaux non immunisés.

TRANSFERT PASSIF

Dans une première expérience, le sérum provenant d'animaux immunisés a été transféré à un groupe d'animaux, les cellules de la rate des mêmes souris immunisées à un autre groupe. La tumeur a été greffée à ces animaux ainsi qu'à des témoins les uns ayant reçu du sérum de souris normales, les autres des cellules de rate de souris normales. La date d'apparition des tumeurs a été notée.

Dans une deuxième expérience, on a procédé de la même façon, mais au lieu de cellules de la rate, les animaux ont reçu des cellules de lavage péritonéal.

Cellules spléniques

Les cellules provenant de la rate d'animaux immuns se sont montrées capables de transférer l'immunité à la plupart des animaux neufs qui ont reçu en même temps la greffe tumorale. Sur 10 animaux, un seul a développé une tumeur, assez tardivement.

Cellules d'origine péritonéale

Les cellules d'origine péritonéale se sont aussi montrées efficaces. Deux animaux sur dix ont developpé une tumeur, l'un des deux très tardivement.

Sérum

Le sérum des animaux dont les cellules ont été testées en transfert passif a été testé de la même façon. Il s'est montré peu efficace. On observe un discret retard d'apparition des tumeurs, par rapport aux animaux témoins, mais peu significatif (tableau XVIII).

TABLEAU XVIII

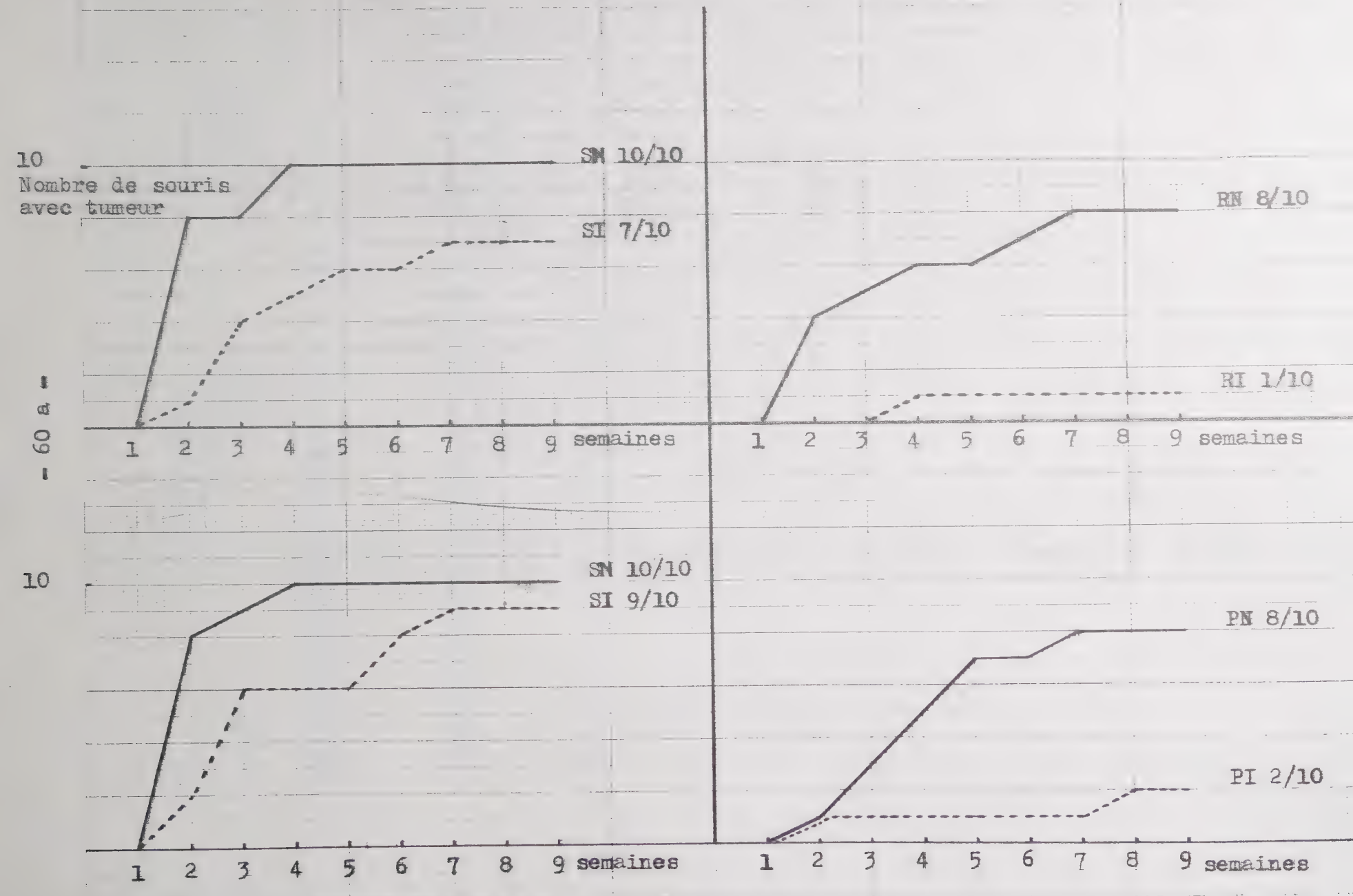


TABLEAU XVIII

TRANSFERT PASSIF DE SERUM : Sérum normal SN

Sérum immun SI

TRANSFERT PASSIF DE CELLULES SPLENIQUES : Rate normale RN

Rate immune RI

TRANSFERT PASSIF DE CELLULES PERITONEALES :

Péritonéales normales PN

Péritonéales immunes PI

RELATION ANTICORPS -RESISTANCE

Pour tenter d'établir s'il existe une corrélation entre le taux d'anticorps, tel qu'on le détecte par le test d'immunofluorescence de membrane, et la résistance des animaux à la greffe tumorale, 2 types d'expériences ont été faits :

Expérience directe

Un groupe de 22 animaux immunisés avec la tumeur AI a été saigné, les sérums testés individuellement en fluorescence, le même jour les souris ont reçu la greffe tumorale, et son développement a été suivi. On connaît donc pour chacun de ces animaux le taux d'anticorps dans son sérum le jour de la greffe, s'il a ou non développé une tumeur, et en combien de temps.

Les animaux n'ayant pas développé de tumeur avaient plus souvent un indice élevé, mais parfois faible. Les animaux qui ont présenté une tumeur avaient un taux faible ou moyen, rarement élevé. Statistiquement, ces résultats ne sont pas significatifs (tableau XIX).

TABLEAU XIX

INDICE DE FLUORESCENCE ET PERIODE DE LATENCE APRES LA GREFFE TUMORALE CHEZ DES ANIMAUX IMMUNISES AVEC LA TUMEUR A1

ANIMAUX IMMUNISES		ANIMAUX TEMOINS
Indice de Fluorescence	Periode de latence	Période de latence
0,35	11 jours	11 jours
0,57	11 jours	11 jours
0,23	11 jours	11 jours
0,66	13 jours	11 jours
0,17	18 jours	11 jours
0,09	19 jours	11 jours
0,17	19 jours	11 jours
0,18	19 jours	13 jours
0,32	45 jours	13 jours
0,32	47 jours	13 jours
0,76	50 jours	16 jours
0,82	- *	16 jours
0,82	-	16 jours
0,77	-	16 jours
0,71	-	18 jours
0,71	-	19 jours
0,64	-	23 jours
0,55	-	25 jours
0,37	-	29 jours
0,35	-	32 jours
0,	-	45 jours
0,	-	-

* Pas de tumeur 3 mois après la greffe

Expérience indirecte

Dans un groupe de souris immunisées avec la tumeur AI, on a testé le sérum en fluorescence, d'une part, son aptitude à transférer une immunité d'autre part, et ceci 3 fois successives, à 2 semaines d'intervalle.

Le taux de fluorescence a été très différent d'une fois sur l'autre, l'effet en transfert passif apparemment nul ou très faible dans les 3 cas (tableau XX).

Avec ces deux expériences, on ne peut donc pas établir de relation entre la quantité d'anticorps sériques telle qu'on la détecte par immunofluorescence, et la résistance de l'animal à la greffe tumorale, ou l'aptitude du sérum à conférer à d'autres animaux une résistance ou une facilitation vis à vis de la greffe tumorale.

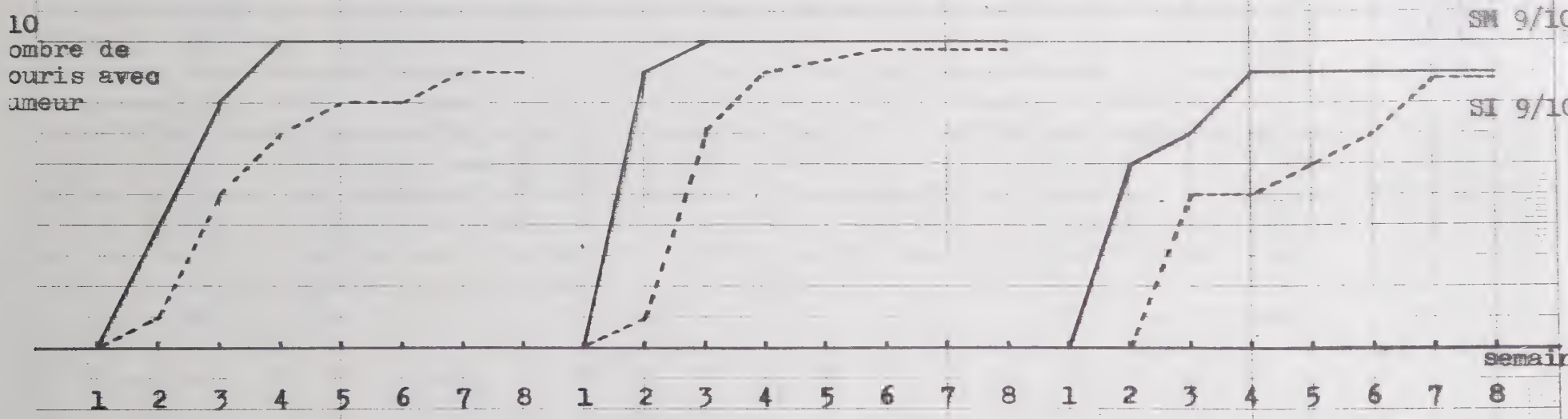
L'immunité semble donc uniquement ou essentiellement de type cellulaire.

TABLEAU XX

TRANSFERT PASSIF DE SERUM : Sérum normal SN

Sérum immun SI

Sérum prélevé 2, 4 et 6 semaines après la fin de l'immunisation.



2 semaines	4 semaines	6 semaines
0,70	0,45	0,14

V - PLASMOCYTES CULTIVES IN VITRO

Aspect cytologique

En microscopie optique les cellules ont une forme allongée, prenant un type fibroblastique, sans inhibition de contact, leurs prolongements se chevauchant. Après coloration de May Grunwald Giemsa, le cytoplasme est rose pâle, avec parfois une région bleue près du noyau. Celui-ci est plus homogène que le noyau du plasmocyte, les nucléoles sont très visibles. Il y a souvent deux noyaux dans une cellule.

En microscopie électronique, le reticulum endoplasmique est moins développé que dans les plasmocytes. On retrouve des particules virales, de type A, mais beaucoup moins nombreuses que dans les plasmocytes d'origine. Nous n'avons pas trouvé de particules C.

Synthèse d'immunoglobuline

Nous avons recherché si ces cellules synthétisaient, comme les cellules d'origine, une immunoglobuline de type IgA. Elle a été recherchée par double diffusion en gélose, avec un antisérum de lapin anti IgA de souris.

- soit dans un broyat de cellules

- soit dans le milieu de culture, après 48 heures de contact avec les cellules. Le milieu a été concentré 10 fois par concentration sous vide, et 50 fois par précipitation par le polyéthylène glycol à 7 %. Nous avons aussi essayé de la détecter en introduisant dans le milieu de culture un hydrolysat de chlorelles marqué au carbone 14, et de rechercher dans les cellules et le milieu de culture une IgA radioactive par autoradiographie.

En aucun cas nous n'avons pu détecter l'immunoglobuline IgA, ni dans le broyat de cellules, ni dans le milieu de culture.

Inoculation à l'animal

Quand ces cellules sont injectées à une souris BALB/c, une tumeur se développe. On voit apparaître et croître la tumeur beaucoup plus rapidement que si on injecte la même dose de cellules provenant de la tumeur A3. Si on injecte 5.10^5 cellules par voie sous cutanée, les tumeurs apparaissent en moyenne en une semaine, et les animaux meurent en moyenne en trois semaines ; si on injecte la même quantité de cellules provenant de la tumeur A3, les tumeurs apparaissent au bout de 5 semaines, et les animaux meurent en huit semaines.

L'examen anatomopathologique d'une tumeur greffée trois semaines auparavant a montré qu'il s'agissait d'une tumeur maligne indiscutable, sarcome parfois fusiforme dans lequel on identifie des cellules réticulaires malignes, mais aussi des plasmocytes.

le sérum de cet animal porteur de tumeur a été examiné en analyse immunoélectrophorétique, pour rechercher la présence d'une IgA de myélome. Mais dans ce sérum, l'IgA apparaissait diminuée par rapport à l'IgA d'un sérum normal, alors qu'elle apparaît considérablement augmentée dans le sérum d'un animal porteur d'une tumeur A3.

Ces cellules sont donc certainement tumorales. Elles ne synthétisent pas de protéines de myélome, du moins en quantité décelable par les techniques utilisées. Elles ont perdu une partie des caractéristiques des plasmocytes.

Nous avons étudié leurs propriétés sur le plan des antigènes de tumeur, en les comparant à celles des cellules de la tumeur d'origine, A3.

Immunisation par des cellules en culture, incubées dans l'iodoacétate de sodium

Des animaux ont été immunisés, avec des cellules en culture, selon la modalité 4 du tableau II.

Deux semaines après la fin des injections, la moitié des animaux immunisés a reçu l'inoculation de cellules provenant de la tumeur A3, 5.10^5 cellules par voie sous cutanée, l'autre moitié des cellules en culture, 5.10^5 par voie sous cutanée. Des animaux témoins non immunisés ont reçu des uns des cellules provenant de la tumeur A3, les autres des cellules en culture, aux même doses.

Les animaux immunisés ont développé moins de tumeurs que les animaux non immunisés. La résistance vis à vis des deux types de cellules, d'origine animale et cultivées in vitro, est comparable. Les résultats sont indiqués dans le tableau XXI.

Tests d'immunofluorescence de membrane

Les animaux immunisés ont été saignés avant la greffe tumorale. Leurs sérums ont été réunis et testés vis à vis, d'une part des cellules provenant de tumeurs, d'autre part des cellules cultivées in vitro. Parallèlement, des sérums d'animaux immunisés avec des cellules provenant de tumeurs ont été testés de la même façon.

Les antisérums anti A3, réagissant bien avec des cellules A3, ne réagissent pas avec des cellules cultivées ne réagissent ni avec des cellules, ni avec les cellules A3.

Afin de rechercher si la réactivité des cellules en culture dépend de leur âge, des cellules passées respectivement depuis cinq jours, deux jours et un jour ont été testées vis à vis d'un même antisérum.

Il s'agit d'un antisérum anti A3, qui réagit fortement avec les cellules A3 (indice de fluorescence, 0,83). Cet antisérum n'a marqué aucune des trois préparations de cellules cultivées.

TABLEAU XXI

IMMUNISATION AVEC DES CELLULES CULTIVEES IN VITRO, INCUBEES DANS L'IODOACETATE DE SODIUM

Immunisation	Tumeur test	Nombre de tumeurs / Nombre d'animaux	
-	A_3	16/20	80 %
Cellules	A_3	5/20	25 %
-	Cellules	20/20	100 %
Cellules	Cellules	5/19	26 %

Afin de rechercher si des antigènes de surface sont masqués, et si on peut les démasquer par un traitement enzymatique ménagé, des cellules incubées respectivement 5, 15 et 60 minutes dans la trypsine ont été testées. Aucune de ces trois sortes de cellules n'a été marquée, avec un antisérum anti A3, qui marquait fortement les cellules A3 (indice de fluorescence : 0,64).

Ces cellules sont donc capables d'immuniser les souris BALB/c, soit vis à vis d'elles mêmes, soit vis à vis de la tumeur A3. Par contre, elles semblent avoir perdu les antigènes de surface que l'on met en évidence par immunofluorescence sur les cellules A3, et sans en avoir acquis de nouveaux.

DISCUSSION

Il est maintenant bien établi que, chez les animaux d'expérience, les tumeurs, qu'elles soient induites par des virus ou par des carcinogènes chimiques, portent des antigènes distincts, capables de susciter des réponses immunologiques, tant cellulaires qu'humorales.

Pour les tumeurs étudiées jusqu'à maintenant, induites par un agent bien défini, puissamment cancérigène, on a pu mettre en évidence, après immunisation :

- une protection vis à vis de la greffe tumorale
- des anticorps circulants
- une immunité de type essentiellement cellulaire.

Ces phénomènes ont été retrouvés dans le système des tumeurs à plasmocytes de la souris Balb/c.

Cette étude amène à poser les problèmes du mécanisme de l'immunité antitumorale, de la nature des antigènes de tumeur, enfin du mécanisme de la tumorigénèse.

Mécanisme de l'immunité

La réponse à l'immunisation peut varier dans son intensité et ceci peut être du à plusieurs sortes de phénomènes :

- le rapport entre la capacité des antigènes à entraîner une réponse et le degré de malignité de la tumeur. Le développement d'une tumeur apparaît comme le résultat d'une concurrence entre le

potentiel malin de celle-ci et les capacités de l'hôte à se défendre contre celle-ci ; la croissance tumorale triomphera :

- si, bien que provoquant une réponse immunitaire importante la tumeur a un potentiel malin plus fort

- ou bien si, malgré un potentiel malin assez faible, la réponse immunitaire est plus faible.

Pour Prehn (37), il existe une relation entre la période de latence d'une tumeur et sa capacité à induire une résistance. Plus le carcinogène est puissant, plus la période de latence est réduite, et plus grandes sont les probabilités d'apparition, d'une part de modifications antigéniques importantes, d'autre part d'une malignité élevée. Si les tumeurs qui surviennent après une longue période de latence possèdent des antigènes spécifiques, ce sont des antigènes faibles.

Les tumeurs à plasmocytes, pour lesquelles il est difficile d'obtenir une résistance solide, entrent dans cette dernière catégorie : le temps qui s'écoule entre l'injection de Bayol F et la survenue de tumeurs, de 6 à 12 mois, correspond à une longue période de latence.

Un autre facteur qui peut entrer en jeu est le phénomène de tolérance :

Certaines souches de souris sont infectées par des virus responsables de tumeurs qui apparaissent spontanément dans ces souches ; il est très difficile d'immuniser ces souris vis à vis de ces tumeurs, les animaux en contact très tôt avec le virus sont tolérants aux antigènes liés aux virus (43).

Dans les tumeurs à plasmocytes, la présence de particules virales dans les tumeurs, et le fait qu'on induit des tumeurs presque uniquement dans la souche de souris Balb/c peut évoquer un phénomène de ce genre, bien que les tumeurs ne soient pas de survenue spontanée et que le rôle d'un virus n'ait pas été mis directement en évidence ; on peut faire l'hypothèse que le Bayol F agirait en activant un virus latent. Il s'agirait d'une tolérance partielle, rendant difficile, mais non impossible l'immunisation.

Dernier facteur, l'équilibre entre la réponse immunitaire liée aux cellules, et la réponse humorale.

On met en évidence, chez les animaux immunisés, la présence de lymphocytes sensibilisés dont le rôle paraît essentiel :

- in vivo, les lymphocytes immuns transférés à des animaux non immunisés confèrent à ces animaux une résistance vis à vis de la greffe tumorale.

- in vitro, ces lymphocytes sont capables, en présence de l'antigène correspondant, ici la cellule tumorale, d'inhiber la migration des macrophages. On peut aussi montrer qu'ils ont une action directe sur les cellules tumorales : les cellules en culture sont détachées de leur support par les lymphocytes immuns.

On détecte aussi chez les animaux immunisés des anticorps circulants.

On a démontré, dans d'autres systèmes, un rôle cytotoxique de ces anticorps, qui n'a pas pu être mis en évidence dans notre système.

On a montré aussi qu'ils pouvaient avoir un rôle facilitant soit en protégeant les cellules tumorales vis à vis d'une cytotoxicité liée aux cellules lymphoïdes, soit en inhibant par un mécanisme

central le développement de l'immunité antitumorale.

Dans notre système, les anticorps sont assez abondants dans le sérum des animaux immunisés, mais il n'a pas été possible de les relier à une fonction biologique, nous n'avons pas pu établir de relation entre résistance à la greffe tumorale et taux des anticorps sériques :

Les animaux qui ont été immunisés pendant 3 semaines et ceux qui ont été immunisés six semaines présentent le même niveau de résistance vis à vis de la greffe ; cependant, les animaux immunisés 6 semaines ont davantage d'anticorps sériques, et ceux-ci persistent plus longtemps.

Dans un groupe d'animaux testés et suivis individuellement, il n'a pas été possible d'établir une relation entre la présence d'anticorps sériques au moment de la greffe, et le développement de celle-ci.

Que l'on transfère passivement à des animaux non traités auparavant du sérum contenant beaucoup ou peu d'anticorps, on n'obtient aucun effet sur le développement de la greffe tumorale.

Les cellules cultivées in vitro induisent une résistance vis à vis de la greffe tumorale, mais pas d'anticorps décelables vis à vis des cellules tumorales. Les antigènes que l'on trouve par immunofluorescence sur les cellules provenant de tumeur animale n'ont pas été retrouvés sur les cellules en culture. Nous avons sans succès essayé de les démasquer en traitant les cellules par la trypsine (103) et de les rechercher dans les cultures relativement agées (104).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'action facilitante des anticorps dans notre système, mais il est difficile d'affirmer que les anticorps n'ont aucune action, car :

- dans les expériences de transfert passif, l'animal qui reçoit l'antisérum et la greffe tumorale n'est pas immunisé, n'a donc pas de lymphocytes sensibilisés ; si les lymphocytes de cet animal ne réagissent pas vis à vis des cellules tumorales en croissance, c'est à dire s'il y a phénomène d'inertie (107-108), on comprend que les anticorps ne puissent pas jouer leur rôle de compétition par blocage des sites réactifs des lymphocytes sensibilisés :

- dans l'expérience où l'on a dosé les anticorps, puis suivi la croissance tumorale chez l'animal immunisé et greffé, on peut penser que résistance de type lymphocytaire et facilitation due aux anticorps sont parallèles, si bien que la tumeur peut croître parce que l'animal a peu de réactivité lymphocytaire et peu d'anticorps, ou au contraire parce qu'il a beaucoup des deux.

On peut donc conclure que les cellules lymphoïdes jouent un rôle important dans la défense antitumorale, il est difficile de conclure en ce qui concerne le rôle des anticorps.

Ce rôle devrait pouvoir être étudié à l'aide des tests in vitro de l'immunité liée aux cellules. Il a été démontré dans d'autres systèmes que les anticorps pouvaient venir interférer dans l'action des lymphocytes immuns sur les cellules tumorales :

l'addition d'antisérums diminue l'action cytotoxique des lymphocytes (74). On a pu montrer dans d'autres cas que les anticorps avaient un rôle opsonisant : sans action par eux-mêmes sur les cellules tumorales, ils rendent actives des cellules lymphoïdes non sensibilisées auparavant. Nous nous proposons de chercher si on retrouve, dans notre système, des effets de ce type.

Il paraît intéressant d'étudier aussi à l'aide de ces tests la cinétique de l'immunité liée aux cellules, et de rechercher si les animaux porteurs de tumeur développent-au moins passagèrement une certaine immunité.

La nature des antigènes de tumeur

Les résultats de l'étude des antigènes de surface par immunofluorescence sont en faveur d'altérations multiples de la surface des cellules tumorales.

On peut penser qu'il existe sur les plasmocytes tumoraux :
- soit un antigène spécifique individuel de tumeur, plus puissant, ou pour lequel l'animal est moins tolérant, et que l'on met en évidence le premier, et un ou plusieurs antigènes communs à plusieur plasmosarcomes, que l'on ne détecte qu'après immunisation plus prolongée
- ou bien que ces différentes altérations existent dans toutes ou la plupart des tumeurs, mais en proportion variable ,si bien que c'est l'une ou l'autre que l'on met d'abord en évidence, selon qu'elle est plus ou moins abondante à la surface des cellules.

Les antigènes responsables de l'immunité sont-ils différents de ceux que l'on détecte par immunofluorescence ?

On admet généralement que l'immunité est liée à des antigènes situés à la surface des cellules, auxquels correspondent des récepteurs situés à la surface des lymphocytes sensibilisés.

Les antigènes de surface détectés par immunofluorescence sont des antigènes auxquels sont capables de se fixer les anticorps correspondants.

Il s'agit dans les deux cas d'antigènes situés à la surface des cellules, détectés par des techniques très différentes. Est-ce que ce sont les mêmes antigènes qui induisent la sensibilisation des lymphocytes et la formation des anticorps ? On a essayé d'établir une corrélation entre les deux :

- par des expériences de transfert passif chez l'animal. Nous avons vu dans l'introduction que les résultats sont très contradictoires.
- par des essais de corrélation entre les anticorps sériques chez les malades porteurs de tumeur, et l'évolution clinique de la maladie. On comprend l'intérêt qu'aurait le dosage d'anticorps antitumeur chez des malades porteurs de tumeur ou en rémission après traitement, si on pouvait en déduire des indications de pronostic. Mais cette recherche, faire surtout chez les malades porteurs de tumeur de Burkitt ne permet pas d'établir cette relation (105).

Des arguments sont en faveur de l'identité des antigènes responsables de l'immunité et de ceux qui fixent les anticorps,

détectés par immunofluorescence ou par cytotoxicité :

- on trouve des réactions croisées entre les tumeurs induites par un même virus, ou par des virus voisins, pour la résistance et pour la cytotoxicité (46). Pour les tumeurs chimiquement induites, on n'obtient pas de réaction croisée, ni pour la résistance, ni pour les réactions d'immunofluorescence (24).
- on pense que les anticorps facilitants se fixent sur les antigènes de surface, bloquant ainsi les sites réactifs avec les lymphocytes sensibilisés.

Il s'agit d'arguments indirects, et la preuve directe qui consisterait à isoler les molécules, chimiquement homogènes, responsables d'une part de la résistance, d'autre part de la formation d'anticorps, n'a pas été apportée.

Une observation plaide en faveur de la nature différente de ces antigènes :

- dans le système des tumeurs induites par le SV 40, on a décrit des lignées qui possèdent des antigènes de surface décelables en immunofluorescence, et pas les antigènes capables d'induire une résistance. Ces lignées ne sont pas sensibles à la résistance induite par des cellules qui possèdent des antigènes (106).

Il faut donc envisager deux hypothèses :

- ou bien il n'y a qu'un seul type d'antigène, capable de s'unir soit aux sites récepteurs des lymphocytes sensibilisés, soit aux anticorps.

Sur ce même type de déterminant antigénique pourrait se fixer soit un site anticorps, soit un récepteur de lymphocyte. On

devrait dans ce cas pouvoir détecter une compétition entre les anticorps et les lymphocytes sensibilisés. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'action facilitante des anticorps, mais nous avons vu qu'il faut peut-être s'adresser à d'autres techniques pour détecter cette activité. Dans les cellules cultivées in vitro, il y a dissociation apparente entre les deux types d'antigènes : les cellules sont capables d'immuniser, mais pas d'induire la formation d'anticorps. Cette dissociation n'est peut-être que quantitative : il est possible que ces cellules possèdent suffisamment d'antigène pour induire une résistance et être sensibles aux lymphocytes sensibilisés, pas assez pour induire des anticorps et pour que la fixation de ceux-ci soit visible en fluorescence. Il est possible que la synthèse des antigènes de surface varie avec les conditions de culture, la composition du milieu, la vitesse de multiplication des cellules, et ceci devra être étudié.

- cependant la deuxième hypothèse, selon laquelle les antigènes responsables de la résistance et responsables de la formation d'anticorps sont de nature différente, permet d'expliquer plus simplement nos résultats. Les anticorps formés seraient le témoin de l'immunisation, mais n'agiraient pas sur le plan biologique, sur la croissance tumorale. Ils pourraient agir, dans d'autres systèmes, par empêchement stérique ; cette action dépendrait de la proximité et de la densité des différents sites antigéniques à la surface de la cellule.

S'il existe 2 types d'antigènes, les uns responsables de la réponse cellulaire, les autres de la réponse humorale, la constitution de la surface des cellules tumorales apparaît très complexe. C'est un problème important, la réponse cellulaire étant efficace dans l'immunité antitumorale, la réponse humorale pouvant avoir un effet inverse. Il serait essentiel de caractériser les antigènes correspondants. Pour celà, il faut fractionner les cellules tumorales, et étudier l'action de ces fractions, in vivo et in vitro.

Mécanisme de la tumorigénèse

On pouvait espérer que l'étude immunologique de ces tumeurs permettrait de les classer dans une des deux grandes catégories de tumeurs induites :

- par des cancérigènes chimiques, avec leur antigène individuel de tumeur
- par des virus, avec leur antigène commun aux tumeurs induites par le même virus.

Nos résultats en immunofluorescence, en faveur demodifications multiples de la surface des cellules tumorales ne nous permettent pas de classer ces tumeurs dans une de ces catégories. La coexistence d'antigènes individuels et communs à plusieurs tumeurs a été démontrée pour des tumeurs induites par un cancérigène chimique, le méthylcholanthrène (40) et dues à un virus, le virus des tumeurs mammaires de souris (48 - 50) et semble probable dans les lymphomes de Burkitt (109). Des antigènes multiples ont donc été décrits dans un très petit nombre de systèmes, mais appartenant aux deux catégories.

Les modifications de la surface des cellules tumorales sont donc sans doute plus complexes qu'on ne l'avait pensé d'abord.

De toute façon, l'approche immunologique n'a pas permis de déduire quel est l'agent causal de ces tumeurs. Les particules d'aspect viral, de type A, intracellulaires, contenant de l'ARN, sont retrouvées de façon très constante dans les plasmocytes tumoraux. Le bayol F, ou du moins un agent d'irritation, paraît indispensable pour l'apparition de ces tumeurs, les tumeurs spontanées sont exceptionnelles. Ceci suggère l'hypothèse d'un virus latent, qui serait activé par un agent chimique ou physique. Cette hypothèse est à rapprocher des conceptions de Huebner (110, 111) pour lequel les tumeurs seraient dues à des virus ARN, pouvant être exprimés dans les cellules tumorales soit complètement (particule C), soit d'une façon très partielle (transformation tumorale). Nous nous trouverions ici à un niveau d'expression intermédiaire (particule A). Pour cet auteur, un agent viral (virus à ADN), physique ou chimique, viendrait activer le virus à ARN masqué, à moins que le démasquage ne se fasse spontanément (tumeurs spontanées des animaux âgés).

Ce démasquage serait dû à une dérépression d'un gène complet (virogène) ou partiel (oncogène) qui existerait dans le génome cellulaire, mais qui serait réprimé à l'état normal. A l'expression de l'oncogène correspond un antigène spécifique de groupe, antigène gs. Cet antigène apparaît très différent des

antigènes de surface, par sa localisation (intracytoplasmique et intranucléaire) et par sa distribution, retrouvé dans de nombreuses tumeurs d'origines différentes, dans des espèces différentes Watson et coll (112) ont retrouvé cet antigène gs dans des plasmocytes cultivés in vitro. Nous nous proposons de rechercher l'antigène gs dans les tumeurs, soit animales, soit cultivées in vitro. Sa présence serait un argument pour rattacher les tumeurs à plasmocytes aux tumeurs à virus ARN.

CONCLUSIONS

Nous avons montré que les tumeurs à plasmocytes de souris possèdent des antigènes spécifiques de tumeur, sur les arguments suivants :

- après immunisation spécifique par des cellules tumorales incubées dans l'iodoacétate de sodium, les animaux présentent une résistance au développement de la greffe tumorale.

- dans le sérum des animaux immunisés, on décèle par immunofluorescence de membrane, des anticorps qui se fixent à la surface des cellules tumorales.

- les cellules lymphoïdes des animaux immunisés réagissent spécifiquement avec les cellules tumorales : ils excercent sur celles-ci une action cytotoxique, et ils libèrent en leur présence un facteur d'inhibition de migration des macrophages.

Nous avons été amené à conclure que les modifications antigéniques de la surface des cellules sont multiples : d'une part, plusieurs déterminants antigéniques sont décelés, par immunofluorescence, les uns spécifiques de chaque tumeur, les autres communs à plusieurs tumeurs. D'autre part, les plasmocytes cultivés in vitro possèdent les antigènes capables d'immuniser les animaux et de réagir avec les cellules lymphoïdes sensibilisées mais les antigènes capables de fixer les anticorps et de les

induire n'ont pas été retrouvés. Cette dissociation fait discuter la possibilité de deux types d'antigènes sur les cellules qui se multiplient in vivo, les uns réagissant directement avec les cellules lymphoïdes, les autres fixant les anticorps humoraux.

Le mécanisme de la défense antitumorale est lié aux cellules lymphoïdes. Les anticorps humoraux ne sont pas cytotoxiques in vitro, et in vivo nous n'avons pu démontrer aucune activité de ces anticorps, ni cytotoxique ni facilitante. Par contre nous avons mis en évidence in vitro, une activité cytotoxique des lymphocytes sensibilisés pour les cellules tumorales, et ces lymphocytes confèrent à l'animal non immunisé une résistance vis à vis de la croissance tumorale.

BIBLIOGRAPHIE

1. TYZZER E.E.

Tumor immunity

J. Cancer Res., 1, 125, 1916.

2. SPENCER R.R.

Tumor immunity

J. Nat. Cancer Inst., 2, 317, 1942.

3. HAUSCHKA T.S.

Immunologic aspects of cancer - A review.

Cancer Res., 12, 615, 1952.

4. FOLEY E.J.

Antigenic properties of methylcholanthrene induced tumors in mice of the strain of origin.

Cancer Res., 13, 835, 1953.

5. PREHN R.T. and MAIN J.M.

Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas

J. Nat. Cancer Inst., 18, 769, 1957.

6. KOLDOVSKY P.

The question of the choice of method to induce antitumor iso immunity.

Folia Biol. (Praha), 7, 115, 1961.

7. OLD L.J. and BOYSE E.A.
Antigenic properties of chemically induced tumors.
Ann. N.Y. Acad. Sc., 101, 80, 1962.

8. PREHN R.T.
Tumor specific immunity to transplanted dibenzanthrace sarcomas.
Cancer Res. 20, 1614, 1960.

9. BALDWIN R.W. and BARKER C.R.
Tumor specific antigenicity of aminoazodye induced rat hepatomas.
Int. J. Cancer, 2, 355, 1967.

10. GORER P.A. and AMOS O.B.
Passive immunity in mice against C5 + B1 Leucosis EL4.
Cancer Res., 16, 338, 1956.

11. PREHN R.T.
Cancer antigens in tumors induced by chemicals.
Fed. Proc., 24, 1018, 1965.

12. HABEL K.
Resistance of polyoma virus immune animals transplanted polyoma tumors.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 106, 722, 1961.

13. SJOGREN H.O., HELLSTROM I. and KLEIN G.
Resistance of polyoma virus immunized mice against transplantation of established polyoma tumors.
Exp. Cell. Res., 23, 204, 1961.

14. KOCH M.A. and SABIN A.B.
Specificity of virus induced resistance to transplantation of polyoma and SV 40 tumors in adult hamsters.
Proc. Soc. Exp. Med. Biol., 113, 4, 1963.

15. KENHA K.S. and ASHKENAZI A.
Immunity in hamsters to cell transformed in vitro and in vivo by SV 40.
J. Immunol., 91, 604, 1963.

16. KLEIN G., SJOGREN H.O. and KLEIN E.
Demonstration of host resistance against isotransplants by lymphomas induced by the cross agent.
Cancer Res., 22, 955, 1962.

17. SACHS L. and MEDINA D.
The transplantability of an X ray and virus induced leukemia i isologous mice inoculatedwith a leukemia virus.
J. Nat. Cancer Inst., 29, 759, 1962.

18. KLEIN E. and KLEIN G.
Antigenic properties of lymphomas induced by the Moloney agent
J. Nat. Cancer Inst., 32, 547, 1964.

19. BIANCO A.R., GLYNN J.P. and GOLDIN A.
Induction of resistance against the transplantation of leukemia induced by Rausher virus.
Cancer Res., 22, 955, 1962.

20. PASTERNAK G. and GRAFFI A.
Induction of resistance against isotransplantation of virus induced myeloid leukemias.
British J. Cancer, 17, 532, 1963.

21. MORTON D.L.
Successful immunization against a spontaneous mammary tumor in C3H mice.
Proc. Am. Ass. Cancer Res., 3, 346, 1962.

22. MOLLER G.
Demonstration of mouse isoantigens at the cellular level by the fluorescent antibody technique.
J. Exp. Med., 114, 415, 1961.

23. LEJNEVA O.M., ZILBER L.A. and IEVLEVA E.S.
Humoral antibodies to methylcholanthrene sarcomata detected by a fluorescent technique.
Nature, 206, 1163, 1965.

24. BALDWIN R.W. and BARKER C.R.
Demonstration of tumor specific humoral antibody against aminoazodye-induced rat hepatomata.
Brit. J. Cancer, 21, 793, 1967.

25. TEVETHIA S.S., KATZ M. and RAPP F.
New surface antigen in cells transformed by Simian papovavirus SV 40.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 119, 896, 1965.

26. MALMGREN R.A. and TAKEMOTO K.K.
Immunofluorescent studies of mouse and hamster cell surface antigens induced by polyoma virus.
J. Nat. Cancer Inst., 40, 263, 1968.

27. GORER P.A. and O'GORMAN P.
The cytotoxic activity of isoantibodies in mice
Transpl. Bull., 3, 142, 1956.

28. SLETTENMARK B. and KLEIN E.
Cytotoxic and neutralisation tests with serum and lymph node cells of isologous mice with induced resistance against Gross lymphoma.
Cancer Res., 22, 947, 1962.

29. STUCK B., BOYSE E.A., OLD L.J. and LARSWELL E.
A new antigen found in leukemias and mammary tumors of the mouse.
Nature, 203, 1033, 1964.

30. WINN H.J.
Effect of complement on sensitized nucleated cells.
Ciba Found. Symp. on Complement. Boston, 1965, p. 133.

31. BLOCK K.J.
Heterogeneity in biologic functions of antibodies
Fed. Proc., 24, 1030, 1965.

32. NELSON D.S.
Immune adherence
Advances Immunol., 3, 131, 1963.

33. YOSHIDA T.O., IMOI K. and SUGYAMA T.
Autoantibody to 7.17 dimethylbenzanthracene induced leukemia cells in rats as detected by immune adherence.
Int. J. Cancer, 3, 720, 1968.

34. NISHIOKA K., IRIE R.F., CHANG S. and TAKUSHI S.
Immunological studies on mouse in mammary tumors.
Int. J. Cancer, 4, 121, 1969.

35. PREHN R.T.
Tumor specific antigens of putatively non viral tumors.
Cancer Res., 28, 1326, 1968.

36. STEIN K.
A new approach to tumor immunity
Nature, 183, 787, 1960.

37. REINER J. and SOUTHAM C.M.
Surther evidence of common antigenic properties in chemically induced sarcomas in mice.
Cancer Res., 29, 1814, 1969.

38. SJOGREN H.O.
Studies of the mecanism of the resistance induced by polyoma infection.
J. Nat. Cancer Inst., 32, 375, 1964.

39. WAHREN B.
Comparison of tumor antigens in A.K.R. and Gross virus induced leukemias.
Nature, 205, 409, 1965.

40. MORTON D.L., GOLMAN L. and WOOD D.A.
Immunological tolerance to spontaneous mammary adenocarcinomas
Proc. Am. Ass. Cancer Res., 6, 47, 1965.

41. OLD L.J., BOYSE E.A. and STOCKERT E.
The G leukemia antigen.
Cancer Res., 25, 813, 1965.

42. GLENN J.P., Mc COY J.L. and FEFER A.
Cross resistance to the transplantation of syngeneic Friend, Moloney and Rauscher cirus induced tumors.
Cancer Res., 28, 434, 1968.

43. LEVY J.P., LECLERC J.C., VARET B. and OPPENHEIM E.
Study of the antigenic specificity of Graffi leukemia cells.
J. Nat. Cancer Inst., 41, 743, 1968.

44. LAVRIN D.H., BLAIN P.B. and WEISS D.W.
Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice
Cancer Res., 26, 929, 1966.

45. VAAGE J.
Non virus associated antigens in virus induced mouse mammary tumors.
Cancer Res., 28, 2477, 1968.

46. HEPPNER and PIERCE C.
In vitro demonstration of tumor specific antigens in spontaneous mammary tumors of mice.
Int. J. Cancer, 4, 212, 1969.

47. VAAGE J., KALINOVSKY T. and OLSON R.
Antigenic differences among virus induced mouse mammary tumors arising spontaneously in the same C3H/Crgi host.
Cancer Res., 29, 1452, 1969.

48. OLD L.J. and BOYSE E.A.
Immunology of experimental tumors.
Ann. Rev. Med., 15, 167, 1964.

49. DE HARVEN E.
Primary methylcholanthrene induced sarcomas. An integrated ultrastructural and immunological study.
6th Intern. Congr. Electron. Microscopy. Kyoto-Tokyo.
Maruzen Co Ltd, 1966, p. 221.

50. BOYSE E.A., OLD L.J., STOCKERT E. and SHIGRNO M.
Genetic origin of tumor antigens.
Cancer Res., 28, 1280, 1968.

51. BALDWIN R.W.
Tumor specific immunity against spontaneous rat tumors
Int. J. Cancer, 1, 257, 1966.

52. BALDWIN R.W. and EMBLETON M.J.
Immunology of spontaneously arising rat mammary adeno carcinomas.
Int. J. Dancer, 4, 430, 1969.

53. HAMMOND W.G., FISHER J.G. and ROLLEY R.T.
Tumor specific transplantation immunity to spontaneous mouse tumors.
Surgery, 62, 124, 1967.

54. REVESZ L.

Detection of antigenic differences in isologous host tumor systems by pretreatment with heavily inactivated tumor cells.

Cancer Res., 20, 443, 1960.

55. RIGGINS R.S. and PILCH Y.H.

Immunity to spontaneous and methylcholanthrene induced tumors in inbred mice.

Cancer Res., 24, 1994, 1964.

56. KLEIN E., and SJOGREN H.O.

Humoral and cellular factors in homograft and isograft immunity against sarcoma cells.

Cancer Res., 20, 452, 1960.

57. HELLSTROM I.

A colony inhibition technique for demonstration of tumor cell destruction by lymphoid cells in vitro.

Int. J. Cancer, 2, 65, 1967.

58. TAKASUGI M. and KLEIN E.

A micro assay for cell-mediated immunity

Transplantation, 9, 219, 1970.

59. BUBENIK J., PERLMANN P., HELMSTEIN K. and MOBERGER G.
Cellular and humoral immune responses to human urinary bladder carcinomas.
Int. J. Cancer, 5, 310, 1970.

60. GEORGE M. and VAUGHAM J.H.
In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111, 514, 1962.

61. DAVID J.R.
Delayed hypersensitivity in vitro : its mediation by cell-free substances formed by lymphoïd cell-antigen interaction.
Proc. Nat. Ac. Sc., 56, 72, 1966.

62. BLOOM B.R., BENNETT B., OETTGEN H.F., MAC LEAN E.P. and OLD L.J.
Demonstration of delayed hypersensitivity to soluble antigens o chemically induced tumors by inhibition of macrophage migration.
Proc. Nat. Ac. Sc., 64, 1176, 1969.

63. OLD L.J., BOYSE E.A., CLARKE D.A. and CARSWELL E.
Antigenic properties of chelically induced tumors
Ann. N.Y. Acad. Sc., 101, 80, 1962.

64. SLETTENMARK B. and KLEIN E.
Cytotoxic and neutralization tests with serum and lymph node cells of isologous mice with induced resistance against Gross lymphoma.
Cancer Res., 22, 947, 1962.

65. BARD D.S. and PILCH Y.H.
The role of the spleen in the immunity to chemically induced sarcoma in C3H mice
Cancer Res., 29, 1125, 1969.

66. HELLSTROM I. and SJOGREN H.O.
Demonstration of H2 isoantigens and polyoma specific tumor antigens by measuring colony formation in vitro.
Exp. Cell Res., 40, 212, 1965.

67. HELLSTROM I. and SJOGREN H.O.
In vitro demonstration of humoral and cell bound immunity against common specific transplantation antigen of adenovirus induced mouse and hamster tumors.
J. Exp. Med., 125, 1105, 1967.

68. HELLSTROM I., HELLSTROM K.E. and PIERCE G.E.
In vitro studies of immune reactions against autochtonous and syngeneic mouse tumors induced by methylcholanthrene and plastic discs.
Int. J. Cancer, 3, 467, 1968.

69. BUBENIK J. and TURANO A.
Enhancing effect on tumor growth of humoral antibodies against tumor specific transplantation antigens in tumor induced by immune sarcoma virus.
Nature (Lond.), 220, 928, 1968.

70. MOLLER G.
Effect on tumor growth in syngeneic recipients of antibodies against tumor specific antigens of methylcholanthrene induced sarcomas.
Nature, 204 846, 1964.

71. BUBENIK J. and KOLDOVSKY P.
A contribution to the antigenicity of spontaneous lymphoid A.K.R. leukemia
Folia Biol., (Praha), 10, 293, 1964.

72. BUBENIK J., KOLDOVSKY P.
Heterogeneity of antitumor antibodies.
Folia Biol. (Praha), 11, 240, 1965.

73. HELLSTROM I. and HELLSTROM K.E.
Studies on cellular immunity and its serum mediated inhibition in Moloney virus induced mouse sarcomas.
Int. J. Cancer, 4, 587, 1969.

74. HEPPNER G.H.
Studies on serum mediated inhibition of cellular immunity to spontaneous mouse mammary tumors.
Int. J. Cancer, 4, 608, 1969.

75. POTTER M., BOYCE C.R.
Induction of plasma cell neoplasms in strain BALB/C mice with mineral oil and mineral oil adjuvants
J. Nat. Cancer Inst., 25, 847, 1960.

76. HERMANN G., LESPINATS G. et BARTHOLOMEW R.W.
Etude immunochimique de 7 lignées transplantables de plasmocytosarcomes de la souris BALB/c
Pathologie-Biologie, 14, 914, 1966.

77. FAHEY J.L., WUNDERLICH J., MISHELL R.
The immunoglobulins of mice.
J. Exp. Med., 120, 223, 1964.

78. Mc INTIRE K.R., ASOSKY, POTTER M., KUFF E.L.
Macroglobulin producing plasma cell tumor in mice.
Identification of a new light chain.
Science, 150, 361, 1965.

79. POTTER M., DREYER W.J., KUFF E.L., Mc INTIRE K.R.
Heritable variation in Bence-Jones protein structure in an inbred strain of mice.
J. Mol. Biol., 8, 814, 1964.

80. POTTER M., APELLA E., BEISSIER S.
Variations in the heavy polypeptide chain structure of gamma myeloma immunoglobulins from an inbred strain of mice and a hypothesis as to their origin.
J. Mol. Biol?, 14, 361, 1965.

81. RASK MIELSEN R., EBBSEN P.
Reticular neoplasms induced in DBA/2 and CBA mice by intraperitoneal injection of mineral oil.
J. Nat. Cancer Inst., 35, 83, 1965.

82. MERWIN R.M., REDMON L.W.
Induction of plasma cell tumors and sarcomas in mice by diffusion chambers placed in the peritoneal cavity
J. Nat. Cancer Inst., 31, 997, 1963.

83. HERMANN G., LESPINATS G. et LOISILLIER F.
Apparition de tumeurs sarcomateuses après injection intrapéritonéale de Bayol F chez la souris.
Bulletin du Cancer, 52, 379, 1965.

84. DUNN T.B.
Normal and pathologic anatomy of the reticular tissu in laboratory mice.
J. Nat. Cancer Inst., 14, 1281, 1954.

85. BERNHARD W.

The detection and study of tumor viruses with the electron microscope.

Cancer Res., 20, 712, 1960.

86. PARSONS D.F., DARDEN E.B., LINDSLEY D.L., PRATT G.T.

Electron microscopy of plasma cell tumors of the mouse.

J. Bioph. Bioch. Cytol., 9, 353, 1960.

87. DALTON A.J., POTTER M., MERWIN R.M.

Some ultrastructural characteristics of a series of primary and transplanted plasma cell tumors of the mouse.

J. Nat. Cancer Inst., 26, 1221, 1961.

88. RIFKIND R.A., OSSERMAN E.F., HSU K.C., MORGAN C.

The intracellular distribution of gamma globulin in a mouse plasma cell tumor as revealed by fluorescence and electron microscopy.

J. Exp. Med., 116, 423, 1962.

89. BREYERE E.J., MOLONEY J.B., JORDAN W.P.

Biological studies on a leukemia virus extracted from C_3H plasma cell tumor 70 429.

J. Nat. Cancer Inst., 37, 699, 1966.

90. EBBESEN P., RASH MIELSEN R., Mc INTIRE K.R.
Plasma leukemia in BALB/c mice inoculated with subcellular material.
J. Nat. Cancer Inst., 41, 473, 1968.

91. OLD L.J., BOYSE E.A.
Antigens of tumors and leukemia induced by virus
Fed. Proc., 24, 1009, 1965.

92. OLD L.J., BOYSE E.A., BEERING G., OETTGEN H.F.
Serological approaches of the study of cancer in animals and in man.
Cancer Res., 28, 1288, 1968.

93. SCHUBERT D., JOBB A., MELVIN LOHN
Mouse myelomas producing precipitating antibody to nucleic acid bases and/or nitrophenyl derivatives.
Nature, 220, 883, 1968.

94. EAST J., DE SOUZA M.A.B., PARROTT D.M.V.
Immunopathology of New Zealand Black mice
Transplantation, 3, 711, 1965.

95. MELLORS R.C. and HUANG C.Y.
Immunopathology of NZB/Bl mice
J. Exp. Med., 125, 53, 1967;

96. WHISSON M.E. and CONNORS T.A.
Drug induced regression of large plasma cell tumor
Nature (Lond)., 205, 406, 1965.

97. YAMADA H., YAMADA A. and HOLLANDER V.P.
Role of cellular and humoral factors in the destruction of nascent plasma cell tumors.
Cancer Res., 29, 1420, 1969.

97. bis SACHS L. and HELLER E.
The sex-linked histocompatibility antigens.
J. Nat. Cancer Inst., 20, 555, 1958.

98. APPFEL C.A., ARNASON B.G. and PETERS J.H.
Induction of tumor immunity with tumor cells treated with iodoacetate.
Nature (Lond.), 290, 694, 1966.

99. MADDEN R.E. and BURK D.
Production of viable single cell suspension from solid tumors.
J. Nat. Cancer Inst., 27, 841, 1961.

100. DAVIES D.A.

Soluble mouse H.2 isoantigens

Transplantation, 5, 31, 1967.

101. MOTET D. and BERGHEDEN C.

Separation of specific antibodies to H2 antigens.

Int. J. Cancer, 2, 651, 1967.

102. PARAF A., MOYNE M.A., DUPLAN J.F., SCHERRER R., STANISLAWSKI M., BETTANE M., LELIEVRE L.
Differentiation of mouse plasmocytomas in vitro : two phenotypically stabilized variants of the same cell
Proc. Nat. Ac. Sc. (N.Y.), 1970, à paraître.

103. HAYRY P., DEFENDI V.
Surface antigen of SV 40 transformed cells
Virology 41, 22, 1970.

104. CIKES M.
Antigenic expression of a murine lymphoma during growth in vitro.
Nature (Lond.), 225, 645, 1970.

105. KLEIN G., GEERING G., OLD L.J., HENLE G., HENLE W., CLIFFORD V.
Comparison of the anti EBV titer and the EBV associated membrane reactive and precipitating antibody levels in the sera of Burkitt lymphoma and nasopharyngeol carcinoma patients and controls.
Int. J. Cancer, 5, 185, 1970.

106. TEVETHIA S.S., DIAMONDOPOULOS G.T., RAPP F., ENDERS J.F.
Lack of relationship between virus specific surface and transplantation antigens in hamster cells transformed by simian papovavirus SV 40.
J. Immunol., 101, 1192, 1968.

107. MIKULSKA Z.B., SMITH C., ALEXANDER P.
Evidence for an immunological reaction of the host directed against its own actively growing primary tumor.
J. Nat. Cancer Inst., 36, 29, 1966.

108. BARSKI G., YOUN J.K.
Evolution of cellèmediated immunity in mice bearing an antigenic tumor. Influence growth and surgical removal.
J. Nat. Cancer Inst., 43, 111, 1969.

109. SVIDMYR A., DEMISSIE A., KLEIN G., CLIFFORD P.
Antibody patterns in different human sera against intracellular and membrane antigen complexes associated with Epstein-Barr virus.
J. Nat. Cancer Inst., 44, 595, 1970.

110. HUEBNER R.J. and TODARO G.I.
Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer
Proc. Nat. Ac. Sc., 64, 1087, 1969.

111. HUEBNER R.J.
Group specific antigen expression during embryogenesis of the genome of the C. type RNA tumor virus : implications for ontogenesis and oncogenesis.
Proc. Nat. Ac. Sc., 67, 366, 1970.

112. WATSON J., RALPH P., SARKAR S. and COHN M.
Leukemia viruses associated with mouse myeloma cells
Proc. Nat. Ac. Sc., 66, 344, 1970.